UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1957 – N° 108

Contribution à l'étude in vitro du mode d'action des principaux antibiotiques sur les enzymes

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Lundi 22 Juillet 1957

par

Bernard BRISOU

Né le 26 Novembre 1932 à BORDEAUX (Gironde)

Élève de l'École Principale du Service de Santé de la Marine
Ancien Externe des Hôpitaux
Lauréat de la Faculté
Diplomé de Médecine Tropicale
Certifié de Chimie Biologique

Examinateurs de la Thèse

MM. TAYEAU, professeur, *président*
AUBERTIN, Professeur
PAUTRIZEL, Professeur
MASQUELIER, Professeur

Juges

BORDEAUX
IMPRIMERIE SAMMARCELLI FRÈRES
80 bis, Cours de l'Argonne

1957

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1957 — N° 108

Contribution à l'étude in vitro du mode d'action des principaux antibiotiques sur les enzymes

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Lundi 22 Juillet 1957

par

Bernard BRISOU

Né le 26 Novembre 1932 à BORDEAUX (Gironde)

Élève de l'École Principale du Service de Santé de la Marine
Ancien Externe des Hôpitaux
Lauréat de la Faculté
Diplomé de Médecine Tropicale
Certifié de Chimie Biologique

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Examinateurs de la Thèse

MM. TAYEAU, professeur, *président*
AUBERTIN, Professeur
PAUTRIZEL, Professeur
MASQUELIER, Professeur
} *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE SAMMARCELLI FRÈRES
80 bis, Cours de l'Argonne

1957

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE, PORTMANN
DOYEN : M. SIGALAS. — ASSESSEUR : M. TAYEAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS BEAUVIEUX, CREYX, MAURIAC, BONNIN, GOLSE.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DE GRAILLY
	BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN
	MASSÉ
Clinique d'accouchements	M. RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	LÉGER
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIECHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	MASQUELIER
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Immunologie (T. P.)	R. PAUTRIZEL
Bactériologie	G. MOUSTARDIER

	MM.
Zoologie et parasitologie	SIGALAS
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique	BESSIÈRE
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	MORETTI
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	G. PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J. TRAISSAC
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DUBARRY
Carcinologie	LACHAPÈLE
Physique pharmaceutique T. P.)	P. BLANQUET
Hydrologie pharmaceutique (T. P.)	P. CAZAUX

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), Mlle ROUGIER (Physiologie),
MM. LAUMONIER (Médecine opératoire), DESPONS (Oto – rhino – laryngologie)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Anatomie	RIGAUD
	CABANIE
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE
Physique médicale	DUHAMEL

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
	ROMAIN
Pharmacie (2e Section)	QUILICHINI
Histologie	R. STOLL

CHARGE DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. J. MARQUEVIELLE (Biochimie médicale), M. BIRABEN (Anatomie Pathologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN
	LENG-LÉVY
	LAVIGNOLLE
	MARTIN-DUPONT
	DAVID-CHAUSSE
	J. RIVIÈRE
Chirurgie générale	CHAVANNAZ
	VILLAR
	TINGAUD
	DEPAULIS
	DARMAILLACQ

	MM.
Obstétrique	CHASTRUSSE
	FAUGÈRE
Ophtalmologie	CORCELLE
Oto-rhino-laryngologie	M. PORTMANN
Dermatologie et shyphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE
Neurologie et psychiatrie	BLANC
Pneumo-phtisiologie	FREOUR

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
	FAUGÈRE
Puériculture	VERGER
	PÉRY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique analytique	NIVET
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	VILLAR
	CHAVANNAZ
	TINGAUD
	LAPORTE

	MM.
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	Mme LINQUETTE
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'ÉPÉE
Séméiologie médicale	RIVIÈRE J.
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLL
Bactériologie	DULONG DE ROSNAY
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN
	LENG LÉVY
	LAVIGNOLLE

Le Secrétaire principal de la Faculté : GAYRAUD

Par délibération du 5 Août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A MON PERE

Qu'il trouve ici l'expression de ma grande admiration et de ma tendresse filiale.
Je lui associe :

MA MERE

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES GRANDS-PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A MON ONCLE M. LEFORT

A Monsieur R. BABIN

Pharmacien-Chimiste en Chef de 1re Classe C.R.
Professeur Agrégé du Service de Santé de la Marine
Docteur en Pharmacie
Docteur ès Sciences
Chargé de Cours à la Faculté
Chef du Service de Biochimie à la Fondation Bergonié
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes Académiques

Avec ma profonde reconnaissance pour tous les conseils et services qu'il m'a prodigués.

A MES PROFESSEURS DE L'ECOLE

A Monsieur le Médecin Principal MORICHAU-BEAUCHANT

Professeur Agrégé de Bactériologie et d'Hygiène
de la Marine

A Monsieur J. COLIN

Second-Maître de 1re Classe, Infirmier de la Marine
Certifié Aide-Bactériologue
Préparateur au Laboratoire de l'Ecole Principale
du Service de Santé de la Marine
et de la France d'Outre-Mer
Médaille Militaire
Médaille des Anciens Combattants
Médaille de la Commémoration d'Indochine

A MES AMIS ET CAMARADES

A M. le Médecin Général de 2e Classe P. LAHILLONNE

Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la marine et de la France d'Outre-Mer
Médecin des Hôpitaux maritimes
Commandeur de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945
Officier du Mérite Maritime.

A Monsieur le Médecin en Chef de 1re Classe CONSTANS

Sous-Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et de la France d'Outre-Mer
Spécialiste des Hôpitaux Maritimes
Officier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre (1939-1945)

A MES JUGES :

Monsieur le Professeur J. MASQUELIER

Professeur de Matière Médicale
Docteur ès Sciences

Monsieur le Professeur R. PAUTRIZEL
Professeur d'Immunologie
Docteur ès Sciences
Directeur du Laboratoire Départemental de Sérologie
Expert de l'Organisation Mondiale de la Santé.
Croix de Guerre 1939-1945
Officier des Palmes Académiques

Monsieur le Professeur E. AUBERTIN

Professeur de Clinique Médicale et des Maladies Infectieuses
Médecin des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1914-1918
Officier des Palmes Académiques
Chevalier de l'Ordre de la Santé Publique

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

A Monsieur le Professeur F. TAYEAU

Professeur de Chimie Biologique et Médicale

Assesseur au Doyen

Officier des Palmes Académiques

Médaille d'Honneur du Service de Santé de la Marine

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous le remercions bien sincèrement de ses conseils, de son appui et de son amabilité jamais démentie.

INTRODUCTION

Depuis la découverte de l'antibiose mise en évidence par Pasteur et Joubert [90] en 1877, chez les bactéridies charbonneuses poussant en présence de bactéries communes, une multitude de découvertes ont été effectuées dans ce domaine. Mais ce n'est qu'avec les travaux de Fleming et coll. et à cause des nécessités de la deuxième guerre mondiale que l'ère des antibiotiques entra dans sa phase industrielle.

Dès la découverte de la merveilleuse Pénicilline, un immense espoir envahit les chercheurs qui dans le monde entier collectionnèrent toutes les moisissures possibles et firent agir les extraits de leurs cultures ainsi que ceux de multiples bactéries sur des germes variés. Cette course aux antibiotiques s'est révélée fructueuse. Toutes ces nouvelles médications furent employées en thérapeutique immédiatement après l'étude grossière de leurs caractéristiques chimiques, pharmacologiques et toxiques. Mais si divers auteurs définirent les antibiotiques utiles comme ayant la propriété commune d'inhiber les organismes pathogènes sans endommager les tissus de l'hôte animal, bien vite on s'aperçut qu'il n'en était rien, du moins dans une certaine mesure. Ainsi a-t-on été amené à mieux connaître les formules exactes et développées des antibiotiques, non seulement pour essayer d'en réaliser la synthèse industrielle, mais aussi pour déterminer les groupements indispensables à leur action antimicrobienne et réaliser si possible des corps aussi actifs sans en avoir les inconvénients. En réalité l'organisme hôte ne reste pas insensible aux traitements intensifs et surtout prolongés. Il ne faut pas oublier que les mécanismes méta-

boliques se trouvent indentiques, à peu de choses près, dans tout le règne animal et végétal. Comment une chaîne enzymatique, inhibée chez une bactérie, ne le serait plus chez la bactérie voisine ou dans une cellule de métazoaire ? De nombreuses explications ont été données mais aucune ne peut être confirmée aujourd'hui.

Ce n'est que par une étude patiente de l'action des antibiotiques sur les phénomènes vivants et en particulier sur les enzymes aussi bien bactériens qu'endo ou exo-cellulaires de métazoaires variés que nous connaîtrons mieux leurs mécanismes d'action.

Après un rappel de l'effet des antibiotiques les mieux connus (Pénicilline, Streptomycine et Dihydrostreptomycine, Chloramphénicol, et les Tétracyclines) sur les enzymes, nous ferons un exposé détaillé de nos travaux effectués dans ce sens. Après quelques résultats de l'action des antibiotiques sur une lipase, la phosphatase alcaline du sérum humain, l'amylase salivaire humaine, la pepsine stomacale la lipase et la trypsine pancréatiques, nous nous attacherons plus particulièrement à l'étude de l'action des antibiotiques sur l'activité de la papaïne. Ce mélange enzymatique, pour n'être pas d'origine animale, n'en a pas moins un gros intérêt depuis que l'on connaît un peu mieux l'importance de ses groupements-SH. A ce propos nous indiquerons une méthode nouvelle de titrage de la papaïne. Puis nous étudierons l'action de divers antibiotiques sur la fibrinolyse effectuée par cet enzyme ainsi que sur la lyse des caillots de sérum humain. Nous donnerons enfin un aperçu des possibilités d'associations des enzymes protéolytiques et des antibiotiques ainsi que de leur action sur des germes variés en vue d'une application thérapeutique éventuelle.

Tout au long de notre expérimentation nous n'avons utilisé que les antibiotiques répondant à la définition que Waksman donnait en 1951 [132] : « un antibiotique est une substance chimique produite par des micro-organismes, qui

a le pouvoir d'inhiber la croissance et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes en solutions diluées ».

Nous tenons à remercier ici les différents Laboratoires qui ont aimablement mis à notre disposition des antibiotiques en poudre pure : Spécia, Roussel, Ciba, Diamant. Que les Laboratoires Français de Thérapeutiques trouvent aussi l'expression de ma gratitude pour les facilités qu'ils m'ont accordées.

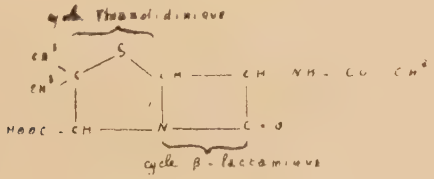
PREMIÈRE PARTIE

Dans une première partie nous avons essayé de grouper quelques unes des très nombreuses publications faites au sujet des antibiotiques pour faire le point des idées que l'on a pu se faire au sujet de leur mode d'action. Si la Pénicilline et la Streptomycine ont déjà fait l'objet d'études d'ensemble [30-63-107-125-130], le mécanisme d'action du Chloramphénicol et des Tétracyclines reste encore assez vague et les communications multiples parues à leur sujet n'ont été groupées, par certains auteurs, que partiellement, ne faisant souvent ressortir qu'un seul côté d'une question fort complexe. Nous essayerons de nous faire une idée, la plus claire possible, des points d'impact de la Pénicilline, de la Streptomycine, du Chloramphénicol et des Tétracyclines avant d'aborder la deuxième partie, expérimentale, de cette thèse.

CHAPITRE I

LA PENICILLINE

En 1929, Sir Alexander Fleming découvrait une substance douée d'un pouvoir antimicrobien produite par un Pénicillium et lui donnait le nom de Pénicilline [38]. Ce ne fut que dix ans plus tard, que l'Ecole d'Oxford isola l'antibiotique [22]. Les travaux ultérieurs sur diverses souches de Pénicillium ont montré l'existence de plusieurs Pénicillines. La plus employée aujourd'hui en thérapeutique est la Pénicilline G, ou Benzyl-Pénicilline, de poids moléculaire 334 et dont l'activité est de 1.167 unités Oxford par milligramme. Sa formule répond au schéma ci-dessous :



De très nombreux travaux faits sur son activité bactériostatique ont montré que la Pénicilline n'exerçait son pouvoir que sur des germes en voie de prolifération; la vulnérabilité de ceux-ci devenant maximum pendant la période de croissance logarithmique. On a été amené ainsi à penser que l'antibiotique agissait en mettant hors d'usage l'équipement enzymatique présidant à la division cellulaire [89]. Nous ne passerons pas en revue toutes les hypothèses proposées, ni tous les travaux effectués jusqu'à ce jour sur le mode

d'action de la Pénicilline. Nous allons essayer de rapprocher les faits importants pour tirer si possible quelques conclusions valables.

Les études faites sur le métabolisme glucidique et sur le creuset d'énergie qu'est le cycle de Krebs ont toutes abouti à la conclusion que ce n'était pas là le point d'impact de la Pénicilline. Ainsi travaillant sur Clostridium sporogenes, Machebœuf et Gros ont déterminé les étapes du métabolisme phosphoglucidique chez cette bactérie [48-51-98]. Ils ont ensuite démontré que la libération d'acide phosphorique à partir du glycérophosphate de sodium n'était pas modifiée par la Pénicilline [50], fait confirmé par Bayliss et coll. [16]. Les mêmes auteurs ont montré que la Pénicilline n'avait aucune action sur la quantité d'esters-phosphoriques formés en présence de glucose [50]. Le métabolisme de l'acide pyruvique, transformable par Cl. sporogenes en acétylphosphate, n'est pas touché non plus par l'antibiotique [49]. Arora et Krishna-Murti [3] enfin, étudiant le cycle de Krebs chez Vibrio choleræ ont montré que la Pénicilline n'avait aucune action sur l'oxydation de ses constituants.

Ce n'est que depuis la découverte de l'interférence de la Pénicilline dans le métabolisme des acides nucléiques que son mécanisme d'action a pu être en partie interprété. Gros et Machebœuf ont étudié la dégradation des acides nucléiques de Cl. sporogenes pendant l'autolyse bactérienne, démontrant la libération d'ammoniaque et celle d'ions phosphoriques [52]. Or, la Pénicilline inhibe ces phénomènes [48] et ralentit la décomposition même des cellules sans modifier le système protéolytique du Clostridium [53]. Machebœuf et coll. ont démontré que cette action ne dépendait pas d'une destruction de la ribonucléo-dépolymérase [54] comme le voulaient Frieden et Frazier [40]. Klotz, Urquhart et Weber [67] n'ont eux aussi jamais pu déceler de complexes entre ribonucléase et Pénicilline. L'action de celle-ci doit être cherchée plus loin, au niveau de la lyse des mononucléotides. De

l'acide guanylique, de l'acide adénylique, de l'acide adénosinetriphosphorique furent soumis au Clostridium sporogenes. L'inhibition de la lyse de ces substrats a toujours été considérable [50 et 52]. Il apparaît que la Pénicilline n'inhibe pas la déphosphorylation des monoculéotides, mais agit expressément sur la réaction qui coupe la liaison entre le pentose et la base [47].

On sait aujourd'hui que les nucléotides ou certains de leurs dérivés, sont des transporteurs d'acide phosphorique et qu'ils participent aux différents métabolismes en tant que cofacteurs. Ainsi peut-on expliquer l'action de la Pénicilline sur plusieurs systèmes enzymatiques, action qui ne serait par le fait même qu'indirecte.

Une réaction très importante est ainsi inhibée : la désamination couplée par oxydo-réduction, dite réaction de Stickland :

$$CH^3 - \underset{\underset{NH^2}{|}}{CH} - COOH + 2\,OH^2 \rightarrow CH^3 - COOH + NH^3 + CO^2 + 4\,H^2$$

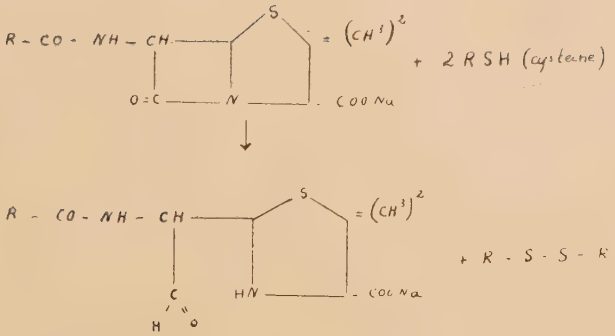
$$4\,H^2 + 2\,\underset{\underset{NH^2}{|}}{CH^2 - COOH} \rightarrow 2\,CH^3 - COOH + 2\,NH^3$$

De nombreux auteurs, Gros et coll. entre autres [51 et 52], ont constaté que la libération d'ammoniaque était en effet inhibée par la Pénicilline. Le transfert d'hydrogène de la réaction aurait pour principal agent, un dérivé du catabolisme de l'acide adénylique. La Pénicilline semble sans effet sur la désamination des acides aminés [99].

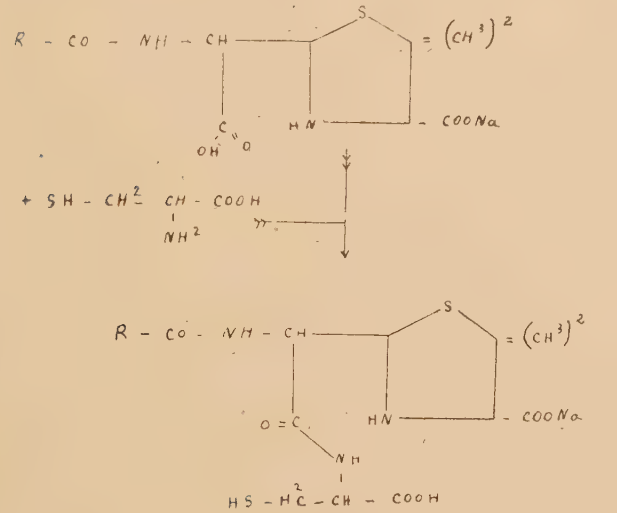
Divers auteurs ont montré l'intervention des mono-nucléotides dans les phénomènes de déshydrogénation enzymatique, par conséquent en rapport avec les modifications du potentiel Red-ox. Ainsi peut-on s'attendre à voir la Pénicilline interférer avec de tels systèmes. Dufrenoy et Pratt [33] ont en effet trouvé des taux élevés du rH dans les zones d'inhibition de croissance des germes en boite de Pétri

sous l'action de la Pénicilline. Ainsi, aux doses bactériostatiques et bactéricides, la Pénicilline provoquerait une augmentation de la vitesse de déshydrogénation, celle-ci l'emportant alors sur la réhydrogénation, perturbant le fonctionnement normal des déshydrogénases et rompant le mécanisme producteur d'énergie nécessaire à la croissance cellulaire. La Pénicilline semble bien interférer avec les groupements SH. L'antibiotique est en effet inhibé par la présence de cystéine [20] mais non par la S. méthyl-cystéine ou le groupement sulfhydryle est bloqué [23]. Barron, en 1944, a soutenu que les effets du cobalt sur les êtres vivants étaient des manifestations d'inhibition des groupes sulfhydryles des enzymes. Pratt, Dufrenoy [95 et 96], Strait et Lamb [116] ont montré l'activation du pouvoir bactériostatique de la Pénicilline par ce métal. Mais il n'est pas entièrement certain que la Pénicilline agisse directement sur les groupements SH. Ainsi Martin-Hernandez et La Fuente [75] ont récemment étudié l'action de la Pénicilline sur la carboylase pyruvique. L'étude des courbes d'action enzymatique en présence de pénicilline les a conduits à penser qu'il se formait des complexes entre une molécule d'enzyme et deux molécules de l'antibiotique. Ce complexe est assez spécifique puisque la présence de séroglobuline, d'ovalbumine, ne réduit pas l'inhibition. Or ces auteurs n'ont pu faire baisser le taux de cette inhibition par l'addition de cystéine ce qui, naturellement, les conduit à penser que la Pénicilline n'interfère pas avec les groupes actifs SH de la cocarboxylase — ce qui d'ailleurs nous surprend, connaissant la structure du pyrophosphate de thiamine.

La Pénicilline n'a aucune action sur l'activité protéohydrolytique du Clostridium [53], mais elle renforce l'activité peptidasique chez cette bactérie [45]. Cette activation serait due, pour Pasynskii et Kastarskaya [91], à la combinaison de la Pénicilline avec la cystéine suivant la réaction :



Aldéhyde pénicilloïque + O → acide pénicilloïque.



créant ainsi un couple avec le fer plus actif que le complexe cystéïne-fer lui-même.

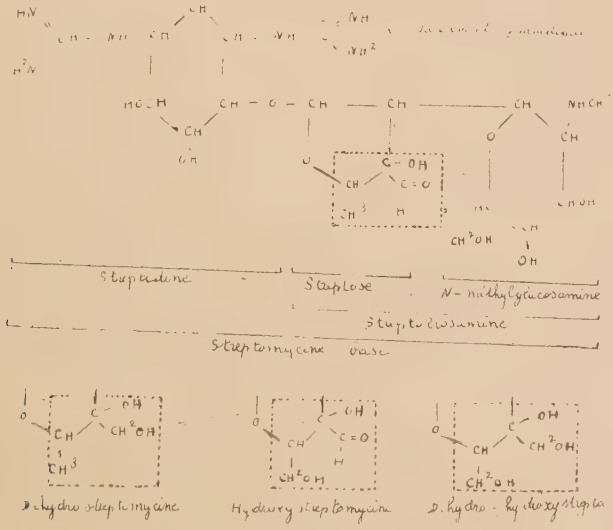
Nous voyons ainsi que si de nombreux points d'attaque de l'antibiotique ont été découverts, on ne peut encore aujourd'hui nettement trancher sur l'action intime de la Pénicilline.

En conclusion : Le seul point qui semble actuellement démontré, est l'action de la Pénicilline sur le métabolisme des mononucléotides.

CHAPITRE II

LA STREPTOMYCINE

En 1952, Waksman se voyait attribuer le Prix Nobel pour la découverte de la Streptomycine. C'est en effet en 1944 que l'auteur, en collaboration avec Schatz et Bugie, isola l'antibiotique d'une souche de Streptomyces griseus [113]. Etudiant les rapports entre la structure de la Streptomycine et son action bactériostatique, Umbreit [24] démontra que les seules modifications qui n'inhibaient pas ce pouvoir étaient celles portant sur le streptose et aboutissant aux quatre corps suivants : Streptomycine, Dihydrostreptomycine, Hydroxystreptomycine et Dihydro-hydroxystreptomycine dont les formules sont les suivantes :



Etudiant l'effet de la Streptomycine sur le métabolisme nucléique, Machebœuf [72] a démontré que la lyse des mononucléotides (ac. guanylique, ac. adénylique, ac. adénosine triphosphorique) était profondément inhibée dans les suspensions de Clotridium. On trouve là l'explication, comme pour la Pénicilline, de l'empêchement de la formation des ions phosphoriques. Mais alors que la Pénicilline n'influe pas sur la dépolymérisation des acides ribonucléiques par la ribonucléo-dépolymérase, la Streptomycine, au contraire, bloque cette action enzymatique en donnant des complexes insolubles avec l'acide ribonucléique. L. Massart [76-77] [78-79] fit le rapprochement entre l'action des colorants basiques par électro-absorption et le mode d'action de la Streptomycine. Ces colorants se fixent sur les macro-molécules à charges négatives, plus spécialement portées par des groupes carbonyles, phosphoriques ou sulfuriques. Pour l'acridine par exemple, l'antagonisme entre les cations acridine) + et cations (Ii) + se manifeste par un échange de cations au profit de l'acridine qui pénétrera dans la cellule et atteindra les acides nucléiques. La Streptomycine agit tout à fait parallèlement, mais avec une affinité encore plus grande pour les acides nucléiques [63]. Les acides nucléiques ne sont d'ailleurs pas les seuls à se combiner avec la Streptomycine, et le Professeur Tayeau a montré [119] que l'antibiotique était capable de former deux sortes de complexes avec les protéïnes sériques : des complexes d'absorption et des complexes électrovalentiels. Bloquant ainsi l'utilisation des mononucléotides, la Streptomycine interfère dans la réaction de désamination couplée des amido-acides ou réaction de Stickland. La Streptomycine n'agit pas sur le départ d'hydrogène, car elle n'inhibe pas la déshydrogénation de l'alanine, mais son inhibition semble plutôt se situer au niveau des réactions accompagnant le transfert de l'hydrogène. De nombreux travaux ont semble-t-il prouvé l'importance des acides nucléiques dans la formation des

protéines Ceux-ci joueraient le rôle d'organisateurs pour le façonnement de nouvelles molécules [131]. La Streptomycine se fixant sur ces moules empêche en effet la formation de certaines molécules comme les enzymes adaptatifs. Polglase [94] montre l'action inhibitrice de la Dihydrostreptomycine sur la formation de la galactosidase par E. coli, et d'autres enzymes adaptatifs du même genre [105].

Si la Pénicilline ne semble pas avoir d'action sur le cycle de Krebs, il n'en est plus de même de la Streptomycine. Henry, Housewright et Berkman [57], étudiant l'oxydation des glucides, du glycérol, des acides lactique, succinique, pyruvique, etc... par des souches de Staphylocoque constatent que l'oxydation de ces composés est freinée par la Streptomycine. Chez Escherichia coli et dans les tissus animaux Umbreit et coll. [122-123-126-127] ont démontré que la Streptomycine inhibait la condensation « oxalacétate-pyruvate », les souches résistantes à l'antibiotique perdent d'une façon caractéristique cette réaction, employant pour leur métabolisme un cycle encore inconnu. Barkuliss montre que la Dihydrostreptomycine inhibe la fermentation de l'acide pyruvique [13 et 14]. Arora et Krishna-Murti enfin [3] étudiant le cycle de Krebs chez Vibrio cholerae ont montré que la Dihydrostreptomycine, si elle n'agit pas sur l'oxydation de l'aspartate et de l'alanine, inhibe la fixation d'oxygène par le vibrion en présence d'acéto-glutarate, de fumarate, de malate, de lactate et surtout de pyruvate et succinate. Il faut cependant remarquer que cette inhibition ne se produit qu'avec des concentrations déjà assez élevées en antibiotique. Or, nous pouvons schématiser l'une des entrées dans le cycle de Krebs de la façon suivante :

$$CH^3 - CO - COOH + \text{Coenzyme A} + DPN + \text{Thiamine-pyroph.} + Mg^{++}$$

$$\downarrow$$

$$\text{Acetyl. - Coenzyme A} + DPNH^2 + CO^2$$

$$\begin{array}{l} CH^2 - COOH \\ | \\ CO - COOH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH^2 - COOH \\ | \\ CHO - COOH + \text{Coenzyme A} \\ | \\ CH^2 - COOH \end{array}$$

Sachant que la cystéïne et les dérivés à groupement sulfhydryle inactivent la Streptomycine, il était tentant de penser, comme l'a fait Cavallito [21], que la Streptomycine pouvait interférer avec les groupements SH, bloquant ainsi le coenzyme A et l'empêchant de se combiner avec le groupe acétyl actif. Mais la Dihydro-streptomycine n'est pas inhibée par la cystéïne et de plus, ce groupe d'antibiotiques n'agit pas sur l'uréase qui possède comme groupes actifs des groupements SH. Ainsi le lieu d'action de la Streptomycine n'est pas ici. Les recherches faites en vue de l'abaissement de la toxicité de la Streptomycine ont conduit à lui adjoindre de l'acide pantothénique, qui effectivement protège en partie les tissus ectodermiques contre son action nocive [64]. Revenant au coenzyme A de Lipman, nous constatons que précisément l'acide pantothénique entre dans sa composition. Ceci n'est pas une preuve suffisante. Le lieu d'action peut être la thiamine qui fait partie de la cocarboxylase. L'acide pyruvique a en effet besoin de ce corps pour se métaboliser tant en phase aérobie qu'anaérobie. On sait de plus, combien la thiamine est indispensable au bon fonctionnement du tissu nerveux. La Streptomycine interférerait-elle avec cette vitamine, comme tendrait à le prouver l'inhibition de la carboxylase pyruvique par la Streptomycine et la Dihydrostreptomycine [74]? Il reste enfin l'action de la Streptomycine sur le transport des ions hydrogènes et sur les cofacteurs qui se chargent de ce transport, en particulier le DPN (diphosphopyridinenucléotide) et nous voici revenu à l'action de la Streptomycine sur le métabolisme nucléique. C'est peut-être aussi par ce mécanisme que l'on peut expliquer l'action de la Streptomycine sur la production de H_2S tant par Entamœba histolytica [69] que Escherichia coli [5], les Brucellæ et Entérobacteriacées [86-87].

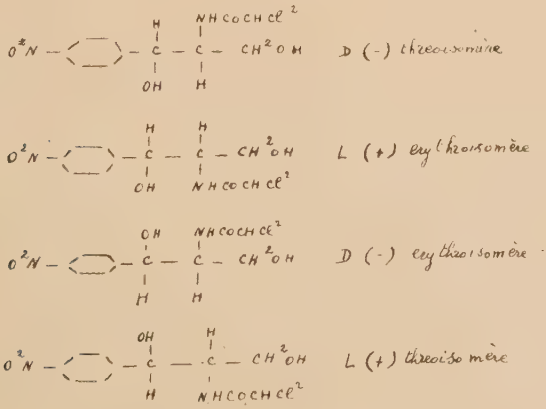
Concluons que la Streptomycine agirait, comme la Pénicilline, sur le métabolisme des acides nucléiques, mais en un lieu d'élection différent dans leurs molécules.

CHAPITRE III

LE CHLORAMPHENICOL

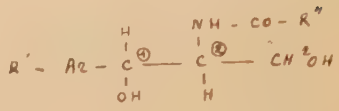
En 1947, Burkholder et Gottlieb isolèrent d'une souche de Streptomyces venezuelæ un nouvel antibiotique qui fut nommé Chloramphénicol [35-46-114]. Cet antibiotique est le seul actuellement produit entièrement par synthèse.

Etudiant la relation entre la formule du Chloramphénicol et son mode d'action, Hahn et ses collaborateurs [55] ont montré que la configuration stérique constitue un principe indispensable à l'activité de certains composés de la série de l'antibiotique. On sait en effet qu'il existe quatre isomères du Chloramphénicol :



Le Chloramphénicol étant le D (—) thréo-I- p-nitrophényl 2 dichloracétamido propanediol 1-3.

Donnant comme formule active :



ils ont montré que seuls le D (—) thréoisomère est très actif, le L (+) érythroisomère n'ayant que 1 à 2 p. 100 du pouvoir bactériostatique du précédent. De plus, le radical « Ar » peut être indifféremment un cycle phényle, biphényle, naphthyle, thiényle, pourvu que R' soit fortement électronégatif. Quelques variations du groupe électronégatif R'' sont possibles, pourvu que le volume moléculaire des substituants soit maintenu dans des limites étroites. Le groupe aminé et l'hydrogène liés au carbone C^2 sont indispensables. Mais de toute façon, aucun dérivé ne surpasse le Chloramphénicol quant au pouvoir bactériostatique.

Wisseman et collaborateurs [133-134] ont démontré que le Chloramphénicol inhibait la synthèse des protéines chez les germes sensibles. Gale et Folkes [41-42] ont approfondi la question, chez Staphylococcus aureus, et ont démontré que le Chloramphénicol exerçait une action sur la formation des protéines sans inhiber celle des acides nucléiques. Ces mêmes résultats ont été retrouvés sur Escherichia coli [84]. Tomizawa et Sunakawa [120], sur le même germe, ont retrouvé des résultats semblables, montrant, par l'artifice de germes infectés par le bactériophage T2, que la synthèse des protéines était indispensable au premier stade de la production d'acide désoxyribonucléique.

Les protéines bactériennes, composées d'amino-acides de forme L ne sont plus produites en présence du D (—) thréoisomère ou Chloramphénicol, alors que les protéines contenant un excès d'acide D-glutamique n'en subissent pas l'effet ; la formation de celles-ci est inhibée par le L (+) erythroisomère (3). Les auteurs ont tout de suite pensé à la possi-

bilité d'un antagonisme entre le Chloramphénicol et les L amino-acides. Cet antagonisme a cependant été rapporté avec la phénylalanine, tryptophane, la β^2-thiénylalanine, la β-phényl-sérine, etc. [80-120-121-135]. Mais de nombreux travaux sont venus infirmer cette assertion (59-68). Swendseid et coll. [118] pensent cependant que le Chloramphénicol peut être antagoniste d'un facteur inconnu indispensable à la synthèse protéïque et à la croissance des germes. Mais nous devons plutôt nous rallier à l'hypothèse de Collins [24], qui pense que l'antibiotique se fixe sur les acides nucléiques. Ceux-ci, se comportant comme des moules où se construisent les protéïnes nouvelles, seraient ainsi dans l'incapacité de remplir leur rôle. Ainsi, les exigences strictes dans la conformation de la chaîne latérale dichloroacétamide sont-elles interprétées comme des facteurs indispensables pour l'encastrement de cette partie de la molécule dans la cavité du récepteur. Le fait qu'un changement dans le système aromatique ne diminue pas de façon notable l'activité de l'antibiotique, suggère que cette partie de la molécule n'est pas incluse dans la structure de l'acide nucléique mais dépasse la surface, masquant ainsi certaines de ses fonctions [55].

On comprend ainsi que le Chloramphénicol inhibe la formation des enzymes adaptatifs. Mais si ce pouvoir de supprimer la néoformation des protéines chez les germes peut paraître suffisant pour expliquer l'action bactériostatique du Chloramphénicol, cette action ne s'arrête pas là. Korotjaev [68], étudiant le mode d'action du Chloramphénicol a montré que celui-ci inhibait les endoprotéines bactériennes et surtout arrêtait les processus de glycolyse. Etudiant le cycle de Krebs chez Vibrio cholerae, Arora et Krishna-Murti [3] ont démontré que le Chloramphénicol avait une action inhibitrice considérable sur l'oxydation des huit substrats suivants : L — alanine, L — aspartate, L — α — céto-glutarate, fumarate, malate, pyruvate, succinate, lactate. Fol-

lette et coll. [39] ont montré une inhibition, par l'antibiotique, de la respiration des leucocytes. Cette inhibition est complète avec une concentration de 6,1 × 10^{-3} molécules. L'auteur fait remarquer que ces concentrations sont très supérieures à celles que l'on peut trouver dans le sérum des malades en traitement, mais suggère qu'une concentration sélective puisse se faire in vivo, comme cela se passe avec le thiouracile dont les concentrations dans la moelle osseuse peuvent atteindre 350 fois celles du sérum. Le rapprochement de ces faits avec l'inhibition d'une deshydrogénase oxytrope et de la xanthine oxydase d'homogénats de foie [117] a porté les auteurs à croire à un antagonisme possible entre le Chloramphénicol et les enzymes à base de flavines, c'est-à-dire avec la vitamine B^2 notamment. Si des expériences directes avec cette vitamine n'ont pas été faites, Follette et coll. n'on pu renverser l'action de l'antibiotique sur la respiration leucocytaire par addition de riboflavine ou de F.A.D. (flavine-adénine dinucléotide). L'action du Chloramphénicol se situe ailleurs, non au niveau de la cytochrome-oxydase [39] mais au niveau du cycle de Krebs. C'est ainsi qu'Arora [3] a renversé l'action de l'antibiotique par un excès de coenzyme A de Lipmann. Il ne semble pas qu'un simple antagonisme intervienne et l'action inhibitrice des transferts d'hydrogène, des oxydo-réductions en un mot, peut s'expliquer par la forte electro-négativité du Chloramphénicol. Ainsi pourrait-on expliquer aussi l'inhibition de la synthèse de l'indole, en présence de l'antibiotique, par E. coli [44].

Le Chloramphénicol semble agir aussi sur les métabolismes de deux autres vitamines du groupe B. Martin-Hernandez [74] a montré, il y a quelques mois, l'action inhibitrice du Chloramphénicol vis-à-vis de la carboxylase-pyruvique. Mais plus intéressante est l'étude de Swendseid et coll. [118] sur les facteurs de croissance de L. citrovorum. Ils découvrirent un nouveau facteur, produit par les tissus hématopoïéti-

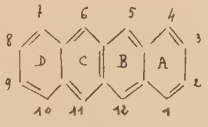
ques mis en présence d'acide folique. Ce nouveau facteur, qu'ils nomment hémofoline, supprime l'inhibition de la croissance de L. citrovorum par le Chloramphénicol. Ainsi cet antibiotique interviendrait dans le métabolisme de l'acide-folique, empêchant son intégration dans un système enzymatique dont un de ses dérivés représenterait le cofacteur.

En résumé, si un antagonisme apparaît possible entre le Chloramphénicol et certaines vitamines, en particulier des dérivés de l'acide folique il semble bien que l'action principale de cet antibiotique soit dû à sa polarité, à ses groupements électro-négatifs perturbateurs des réactions d'oxydo-réduction.

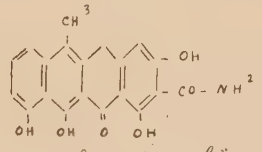
CHAPITRE IV

LES TETRACYCLINES

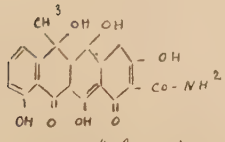
Duggar et coll. [34] en 1948, isolèrent un nouvel antibiotique des cultures de Streptomyces aureofaciens. Sa belle couleur jaune lui valut le nom d'Auréomycine. La Terramycine fut isolée à partir de Streptomyces rimosus par Finlay et coll. en 1950 [36]. Regna (100-101) a essayé d'approfondir les relations entre les formules des Tétracyclines et leur action bactériostatique. Cet auteur a montré que l'Auréomycine ou Chlortetracycline et la Terramycine ou Oxytetracycline avaient en commun un cycle naphtacène et qu'aucune des quatre parties de ce cycle n'avait d'action par elle-même. Il a ainsi isolé un troisième corps, actif bactériologiquement, qu'il désigne sous le nom de Tétracycline. Ce corps est, depuis, entré dans la pharmacopée. La comparaison des divers groupements latéraux des molécules montre à l'évidence ceux qui sont indispensables et ceux qui ne le sont pas.



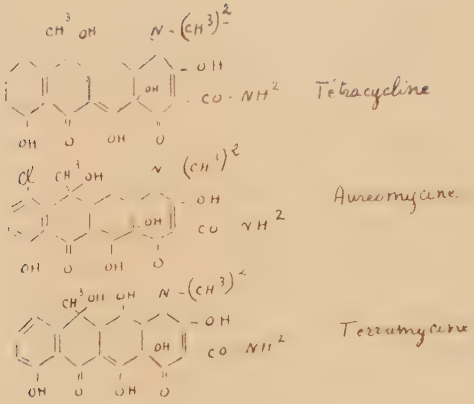
Naphtacène = inactif



Des di methyl amino terra zubäne = inactive



des dimethyl- amino



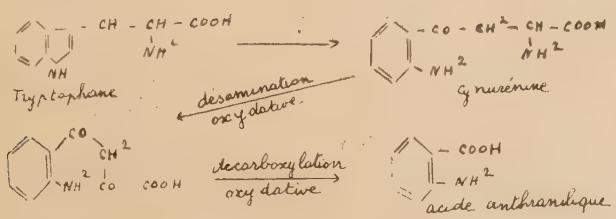
De très nombreux travaux ont été effectués pour expliquer l'action des Tétracyclines. Les auteurs ont presque tous remarqué la facilité avec laquelle ces antibiotiques fixaient des atomes métalliques. Dans son étude chimique de la Terramycine, Regna le signalait déjà [101]. Plus récemment Albert et Rees [1] faisaient encore remarquer cette affinité. Van Meter [128] en 1951 avait inhibé fortement la respiration d'homogènat de foie de Rat avec 0,0001 M d'Auréomycine. Loomis [71] utilisant une préparation de rein, lavé, d'un lapin, avait dissocié la phosphorylation de l'oxydation, cette dernière n'étant pas inhibée par d'aussi faibles concentrations d'Auréomycine. Van Meter et coll. [129] reprirent leurs études démontrant que l'effet inhibiteur de l'auréomycine sur l'oxydation des éléments du cycle citrique n'apparaissait pas en présence d'un excès d'ions Mg++ et de phosphates. Ils en conclurent que l'antibiotique agit comme agent chélatant, empêchant l'action enzymatique en privant celle-ci d'ions indispensables. Ayant trouvé une inhibition de la choline-déhydrogénase et de la succino-déhydrogénase in vitro, Zimmerman et Humoller [137] font agir non plus l'Auréomycine, mais l'antibiotique carbonisé. L'activité enzymatique n'est plus alors perturbée. De même en ajoutant au milieu un agent chélatant puissant, du versène, par exemple, on empêche

l'Auréomycine d'agir. Les auteurs en concluent que l'Auréomycine forme des complexes métalliques qui inhiberaient les systèmes enzymatiques préposés aux phosphorylations et oxydations.

Escherichia coli E 26 sensible à l'Auréomycine, catalyse la réduction des groupements nitrés du Chloramphénicol. Cette réduction est inhibée par de faibles concentrations d'Auréomycine [108]. Saz et Slie [110-111] ont montré que la réaction demandait la présence de DPN (diphosphopyridine nucléotide) de L. malate (remplaçable par DPNH), L cystéïne, d'ions Mn++ et d'une flavine comme transporteur d'électrons. Ce système enzymatique isolé de souches sensibles s'est montré. in vitro, sensible à l'Auréomycine; le même système isolé de souches résistantes, est lui aussi résistant à l'action antibiotique in vitro. Saz et Martinez [109] ont montré que cette différence venait de ce que la nitro-réductase est une métalloflavoprotéine avec Mn ++ comme métal. La réductase résistante est un complexe solide, l'Auréomycine n'ayant pas grand mal à dissocier la réductase sensible grâce à son pouvoir chélatant. Les Tétracyclines apparaissent donc bien jouer un rôle dans les systèmes enzymatiques par leur faculté de complexer les métaux.

Mais là, ne s'arrête pas vraisemblablement l'action de ces antibiotiques. En parcourant la littérature, on est frappé du nombre d'enzymes oxydo-réducteurs qui se voient inhibés par leur présence.

En 1951, Baumgärtel et Zahn [15] ont montré que B. subtilis pouvait, à partir du tryptophane, former de l'acide anthranilitique :



Cette réaction est inhibée par des traces d'Auréomycine. Arora et Krishna-Murti [4] ont trouvé une inhibition de la tryptophanase par les Tétracyclines, empêchant ainsi la formation d'indole chez E. coli, ce que Gibson et coll. [44] ont confirmé en 1956. Il n'est cependant pas possible de penser à un antagonisme entre les Tétracyclines et la pyridoxine qui entre dans la composition des enzymes nécessaires à de telles transformations, car si l'on en croit Osteux et coll. [88] la glutamo-décarboxylase, qui a comme coenzyme de la pyridoxine, ne subit pas l'effet de l'Auréomycine.

Mondolfo et Mondolfo Hounie [81] ont testé plusieurs substances vis-à-vis de l'Auréomycine. Ils sont arrivés à neutraliser partiellement son action bactériostatique par la nicotinamide, le pantothénate de calcium et surtout la thiamine. Or, en 1956, Martin-Hernandez et coll. [73] ont montré que les trois Tétracyclines inhibaient l'action de la carboxylase pyruvique, cet enzyme ayant dans sa formule une molécule de thiamine.

S'il est possible que les Tétracyclines interfèrent dans le métabolisme de diverses vitamines, il semble plus probable de situer leur lieu d'action au niveau des réactions d'oxydoréduction elles-mêmes, sans qu'elles s'attaquent aux coenzymes proprement dits. Ainsi pourrait-on concilier l'action de ces antibiotiques sur des enzymes aussi divers que l'arginase staphyloccique [70] sur la succino-B.M-réductase bactérienne, la fumaricohydratase [62], sur le métabolisme anaérobie de l'acide pyruvique, le cycle de Krebs en général, enfin [3-38]. Souvent même, loin de faire regresser l'inhibition produite par l'antibiotique, l'addition du coenzyme correspondant ne fait que renforcer cette inhibition, cela sans que l'on puisse donner d'explication [3-4]. Gale [43] relève un fait semblable; des concentrations bactériostatiques de Terramycine et d'Auréomycine, font baisser de 90 p. 100 la synthèse des protéines chez les germes sensibles, tout en activant la synthèse des acides nucléiques.

En résumé, il apparaît que les Tetracyclines, en raison de la présence de fonctions polyphénoliques dans leur molécule favorables à la chélation, doivent se comporter comme inhibiteurs enzymatiques de réactions où les effecteurs métalliques coenzymatiques interviennent.

DEUXIÈME PARTIE

Si l'entrée des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique a permis des guérisons spectaculaires, des résultats inespérés, bien vite on s'est aperçu que malgré leur peu de toxicité aigüe, il pouvaient entraîner des troubles graves. Les lésions cochléaires et vestibulaires dues au groupe de la Streptomycine, les accidents anaphylactiques et allergiques dus à la Pénicilline, les accidents sanguins du Chloramphénicol, les diarrhées et syndromes cholériformes dus aux Tétracyclines ont vite alarmé les médecins praticiens. C'est à juste titre que certains s'élèvent contre l'utilisation large des antibiotiques, recommandant la prudence et un peu de sens critique dans le choix de l'antibiotique et de son mode d'administration [18-31]. Les chercheurs ont essayé d'expliquer de tels phénomènes; des études de très grande envergure ont été entreprises. Hines [58] par exemple, collecte de très nombreuses obervations de traitements très prolongés par l'Auréomycine, jusqu'à 3 ans de suite, ne signalant d'ailleurs aucun effet nuisible. Mais en plus de ces travaux sur la toxicité globale, certains auteurs ont étudié l'action des antibiotiques sur des systèmes enzymatiques précis. Faisant suite à ces travaux, nous nous sommes attachés à l'étude de quelques uns de ces systèmes enzymatiques.

Nous traiterons successivement l'action des antibiotiques sur :

— l'amylase salivaire humaine.
— la pepsine stomacale humaine.
— la trypsine et la lipase pancréatiques humaines.
— la phosphatase alcaline du sérum humain.

CHAPITRE PREMIER

Nous avons étudié l'action des antibiotiques sur certains enzymes du tractus digestif : amylase salivaire, pepsine stomacale, lipase et trypsine pancréatiques.

a) Amylase salivaire.

En 1948, Donatelli et Galeotti-Flori [32] démontraient que la Streptomycine exerçait une faible action inhibitrice sur l'α amylase de la salive et la β amylase de la fève de Soja. En 1952, Arora et Krishna-Murti [2] trouvèrent pour leur part que la Dihydrostreptomycine et l'Auréomycine accéléraient les amylases du malt et des champignons, que le Chloramphénicol inhibait partiellement les amylases bactériennes, la Pénicilline restant sans action. En 1956 Burger et coll. [19] trouvèrent que Auréomycine inhibait α amylase d'Aspergillus oryzae. Nous avons repris l'étude des amylases en nous adressant à l'α amylase salivaire. Pour cette étude nous nous sommes d'abord adressé à la méthode de Wohlgemuth, sans cependant employer de tampon.

Nous procédions à des dilutions de salive fraiche centrifugée à 5.000 tours pendant 15 minutes, dilutions allant du 1/25 au 1/3.200.

A 1 ml de la dilution de salive, on ajoutait 2 ml d'amidon soluble à 1 p. 1000, pur pour le témoin, ou contenant l'antibiotique à étudier de telle sorte que la concentration finale de celui-ci fusse de 200 γ/ml à 20 γ/ml.

Après 1/2 heure de bain-marie à 37° C, une goutte d'une solution diluée d'iode révélait les tubes contenant encore de l'amidon non hydrolysé en colorant celui-ci en bleu. Les

résultats exposés dans le tableau ci-dessous expriment l'inverse de la dilution de salive du dernier tube, ne contenant plus d'amidon. La salive utilisée ayant été récoltée sur le même sujet a toujours donné le même chiffre de 400 Le tube contenant la salive diluée au 1/400 ne donnait pas de coloration bleu avec l'iode.

Auréomycine		Terramycine		Tétracycline (Sanclomycine)			
100 g/ml	50 g/ml	200 g/ml	20 g/ml	200 g	100 g	50 g	20 g
25	50	25	400	25	25	50	400
Spiramycine		**Streptomycine**		**Dihydro - streptomycine**			
100 g/ml	50 g/ml	100 g/ml	50 g/ml	100 g/ml		50 g/ml	
200	300	400	400	400		400	

Ainsi les Tetracyclines se montraient-elles fortement inhibitrices. Mais l'absence de tampon enlevait beaucoup à la valeur de nos résultats. Aussi avons-nous repris cette étude en nous servant de la méthode préconisée par Babin et coll. [8].

Substrat initial :

Amidon soluble R. A. L.	2 g.
Chlorure de sodium R. P.	2 g.
Eau bidistillée ..... q. s. p.	100 ml.

On porte au thermostat à eau à 80° C pendant 15 minutes chronométrées en agitant continuellement. On place à la glacière aussitôt. Ce susbtrat ne doit pas être utilisé plus de quelques heures après sa préparation :

— *Choix du tampon* :

On utilise le tampon aux phosphates monopotassique et disodique à pH = 7,4.

— *Pratique de l'hydrolyse :*

Dans du matériel stérilisé, on verse dans l'ordre :

Substrat d'amidon	50 ml.
Tampon 7,4	20 ml.

Lorsque ce mélange est thermostatisé à 37° C. on ajoute la salive centrifugée : 0,25 ml.

On agite en laissant 15 minutes au thermostat à eau à 37° C. Au bout de ce temps, on retire du thermostat, et on arrête l'action diastasique par addition immédiate de 20 ml NaOH 0,1 N.

Titrage du maltose libéré :

Dans 10 ml de liqueur de Bonnans portés à l'ébulition, on verse à la burette l'hydrolysat d'amidon jusqu'au virage feuille morte, de façon à ce que ce virage s'effectue en 2 minutes 30 secondes.

Pour tester l'action des antibiotiques, ceux-ci ont été ajoutés à la dose de 50 mg. avant l'addition de salive. Nous nous sommes assuré, en faisant des témoins, qu'aucun des antibiotiques utilisés n'était par lui-même amylolytique, et ne réduisait pas la liqueur de Bonnans.

Les résultats sont exprimés par le nombre de ml d'hydrolysat nécessaires pour réduire 10 ml de liqueur.

Témoin = 11 ml.	Témoin = 8 ml.
Terramycine = 11 ml.	Auréomycine = 6 ml.
Dihydrostrept. = 8,5 ml.	Dihydrostrept. = 7 ml.
	Magnamycine = 8 ml.

Ainsi, nous rejoignons les résultats d'Arora et Krishna-Murti. L'Auréomycine et la Dihydrostreptomycine accélèrent l'activité de l'amylase.

b) Influence des antibiotiques sur la Pepsine.

Nous nous sommes servis de pepsine titrant 200 par la méthode du Codex. Nous avons préparé le tampon acide suivant :

1 g. de citrate Na cristallisé est dissout dans 10 ml, d'eau distillée; on complète à 100 ml, avec ClH 0,1N.

La pepsine est mise en solution dans ce tampon à raison de 1 p. 100. Cette solution est diluée ensuite dans les tubes d'expérience, 1/2, 1/4, 1/8... à raison de 1 ml par tube. On ajoute alors dans chaque tube 1 ml d'une solution à 0,5 p. 1000 de l'antibiotique dans l'eau distillée. Nous avions ainsi une concentration finale de 250 g/ml dans les tubes, la concentration en pepsine allant de 5 mg./ml. à 80 mg./ml.

Les différents tubes sont mis dans un bain-marie à 37° C. avec des lamelles de gélatine découpées dans des films voilés aux dimensions suivantes :
3 cm × 0,5 cm. Une demi-heure après, on enlève les lamelles et on les plonge dans l'eau. La plaque non digérée laisse suinter une gélatine jaunâtre visqueuse.

Nous avons employé les antibiotiques suivants : Streptomycine, Dihydrostreptomycine, Trétracycline (Sanclo-mycine), Auréomycine, Viomycine.

Aucun de ces antibiotiques n'a eu d'influence sur la digestion de la gélatine par la pepsine. Cela n'était pas étonnant vu le pH très bas d'action de la Pepsine.

Aussi avons-nous essayé une autre méthode éliminant autant que possible l'influence du pH.

Nous plaçons 60 mg. de pepsine et 5 mg. d'antibiotique dans de l'eau distillée (20 ml.) pendant 24 heures dans une étuve à 37° C. Le lendemain nous ajoutons 4,30 ml. de ClH normal, nous complétons à 50 ml, avec de l'eau distillée et nous versons dans un erlenmeyer contenant 2,5 g. de fibrine. Nous effectuons la digestion à 50° C pendant 1 heure. Là aussi les extraits secs de 10 ml de filtrat nous ont donné des chiffres très voisins les uns des autres. Les antibiotiques employés étaient : Auréomycine, Tétracycline, Bacitracine, Pénicilline, Streptomycine, Dihydrostreptomycine, Spiramycine.

Mais de ces expériences nous ne pouvons tirer aucune conclusion, car aux pH actifs de la pepsine, les antibiotiques

sont plus ou moins rapidement détruits ou inactivés. Cependant, on peut affirmer que les antibiotiques laissés *in vitro* 24 heures en présence de pepsine n'ont pas perturbé le titre fibrinolytique de l'enzyme. La seule remarque que l'on puisse faire est que les antibiotiques pris *per os* ne semblent avoir aucune influence sur la digestion stomacale.

c) Action des antibiotiques sur les enzymes pancréatiques.

L'influence de certains antibiotiques à large spectre, comme les Tétracyclines, sur le métabolisme intestinal est aujourd'hui incontestée. Un équilibre instable certes, mais absolument indispensable régne dans le milieu intestinal. Les bactéries, par l'harmonie de leur répartition, participent dans une large mesure au travail de la digestion. Ainsi les tableaux dramatiques habituellement attribués à ces antibiotiques ont-ils fait l'objet de nombreuses recherches qui ont montré qu'un déséquilibre de la flore intestinale favorisait des germes qui, libérés des entraves de leurs voisins, voyaient leurs facultés pathogènes exaltées. Mais il était intéressant cependant de voir si ces antibiotiques, en dehors de leur action sur la flore, ne perturbaient pas la production ou l'action des ferments pancréatiques de l'hôte lui-même. En 1951 Crone et coll. [27] étudièrent l'action de la Pénicilline sur la trypsine et la lipase pancréatiques.

Il procédait de la manière suivante :

Trypsine :

Dans 14 tubes, il mettait :

1 ml. de suc duodénal dilué au 1/500e

1 solution de caséine à 0,5 p. 1000 tamponnée à pH = 7,4.

Dans 7 de ces tubes, il ajoutait 1 ml. d'une solution de Pénicilline à des concentrations différentes.

Dans les 7 autres tubes, il ajoutait 1 ml. d'eau.

Après avoir laissé ses tubes pendant 20 minutes à 37° C., il précipitait la caséïne restante par 5 gouttes d'une solution d'acide acétique à 5 p. 100. Il effectuait la lecture au photomètre.

Lipase :

Dans 14 tubes, Crone plaçait :

1 ml. de suc duodénal dilué au 1/50.

Dans 7 de ces tubes, il ajoutait 1 ml. d'une solution de Pénicilline à des concentrations variables.

Dans les 7 témoins, 1 ml d'eau.

Après 17 minutes de bain-marie à 37° C., la lecture était effectuée au photomètre.

En utilisant ces modes opératoires, Crone a démontré que la Pénicilline n'avait aucune action inhibitrice sur la trypsine et la lipase pancréatiques.

En 1954, Jacobson et Azevedo [62] ont étudié l'action des antibiotiques sur des peptidases pancréatiques.

Le substratum était la DL. leucyl-glycine et les peptidases provenaient d'un extrait pancréatique sec, mis en suspension dans l'eau à raison de 150 mg pour 10 ml.

Ils ont fait le mélange suivant :

Solution enzymatique	1 ml.
Tampon aux phosphates pH 7,4 ..	1 ml.
Eau ..... q. s. p.	50 mg.
DL. leucyl-glycine	5 ml.

Ils procédaient alors à un essai initial et un essai après 6 heures à 37° C.

Pour chaque essai, 0,5 ml de la liqueur était additionnée de 4,5 ml d'éthanol, et neutralisée par la soude 0,02 N en présence de 11 gouttes de thymol-phtaleine à 0,04 p. 100 L'activité fermentaire était alors évaluée par la différence entre le volume de soude consommé avant et après incubation à 37° C.

Ils montrèrent ainsi une nette inhibition des peptidases

pancréatiques par l'Auréomycine, la Terramycine et l'Érythromycine aux concentrations de 50 mg. par essai. Ils rejoignaient ainsi les résultats donnés par Sevag et coll. [112] quelques années plus tôt.

La lipase sérique a aussi fait l'objet de quelques études. Jacobson et Azevedo [61] ont titré l'activité lipasique du sérum de lapin en employant la tributyrine comme substrat, son hydrolyse s'accompagnant de variations de tension superficielle que les auteurs suivaient en comptant le nombre de gouttes correspondant à un certain volume de solution s'écoulant de la pipette de Fritz Köller. Les antibiotiques étaient ajoutés à la dose de 50 mg. pour 1 ml de sérum. Même à ces concentrations très fortes, la lipase a fort bien résisté et a même été activée par l'Auréomycine, la Terramycine et l'Erythromycine.

En 1956, Fischer et coll. [37] ont repris l'étude de l'activité lipasique du sérum chez le Rat soumis, in vivo cette fois-ci, à un traitement par l'Auréomycine.

Ils ont employé la méthode titrimètrique de l'acide butyrique libéré à partir de la tributyrine.

Ils trouvèrent ainsi qu'un traitement par 25 mg. d'Auréomycine pendant 30 jours faisait baisser l'activité lipasique totale des Rats adultes de 45 p. 100, la diminution de l'activité de la lipase résistante à l'atoxyl n'étant que de 30 p. 100. Dans des conditions analogues la Terramycine n'a aucun effet.

Les auteurs ont titré ensuite le pouvoir lipasique humain. L'Auréomycine à la dose de 10 mg pour 0,1 ml de sérum fait baisser l'activité de 27 p. 100, la Terramycine dans les mêmes conditions la fait baisser de 24,4 p. 10.

Nous étions ainsi devant des résultats totalement contradictoires. Nous avons commencé par titrer la lipase dans des produits de tubages duodénaux recueillis 45 minutes après épreuve à la sécrétine chez des sujets humains. Nous avons employé la méthode de Bondi modifiée par Chiray et Lebon.

Dans un petit ballon on met :

Liquide duodénal	2 ml.
Huile d'olive	10 ml.

On laisse 1 heure à l'étude à 37° C après avoir bien émulsionné. On ajoute alors 60 ml d'alcool à 95° et on titre l'acidité libérée par la soude 0,1N.

Les antibiotiques ont été ajoutés en poudre au début de l'expérience à la dose de 50 mg. Seule la Streptomycine s'est bien dissoute. Les autres antibiotiques étaient à saturation. Nous avons ainsi constaté une inhibition de :

70 p. 100 par la Streptomycine;
60 p. 100 par l'Auréomycine et la Terramycine;
55 p. 100 par Tétracycline (Sanclomycine).

Pour le titrage de la trypsine nous avons employé la technique de René Gaultier.

Dans un becher on mélange :

Solution de gélatine à 5 p. 100 neutralisée	50 ml.
Liquide duodénal	1 ml.

On agite et on porte 1 heure à l'étuve à 37° C. Puis on mesure 20 ml du mélange que l'on neutralise par la soude 0,1N ce qui donne n'ml. On ajoute alors 10 ml de formol (formol + alcool à 90°, autant de chaque) neutralisé. On neutralise à nouveau par la soude 0,1N ce qui donne n'ml. Le chiffre n donné est égal à n' + n''.

Les antibiotiques ont été ajoutés au début de l'expérience, à la dose de 50 mg. Par cette méthode, nous avons trouvé que la Streptomycine était légèrement favorable tandis que les inhibitions suivantes étaient constatées.

Auréomycine	10 p. 100
Terramycine	20 p. 100
Tétracycline	30 p. 100

Mais là aussi, nous avions employé des doses très élevées d'antibiotiques. Ayant pu nous procurer de la trypsine cris-

tallisée (Martinet), nous avons opéré sur des caillots de plasma humain. Les caillots sont préparés de la manière suivante

Plasma humain ayant un taux de prothrombine de 100 p. 100 .... 0,1 ml.
Thromboplastine Biolyon ..... 0,2 ml.

Le caillot étant formé, on le lave à l'eau distillée et on le laisse en glacière 24 heures. Au bout de ce temps, on prend pour l'expérience, les seuls caillots intacts.

Dans 3 tubes, sont mis :

Solution de trypsine à 2,5 p. 100 dans 1 tampon aux phosphates à pH 7,1 ..... 1 ml.
Solution d'antibiotique à 0,25 p. 100 dans 1 tampon aux phosphates à pH 7,1 ..... 1 ml.

Dans les 3 tubes témoins, la solution d'antibiotique est remplacée par 1 ml du tampon.

Il suffit de suivre l'évolution de la digestion des caillots qui s'effritent puis disparaissent en étuve à 37° C.

La Streptomycine, la Dihydrostreptomycine, la Terramycine, l'Auréomycine, la Tétracycline n'ont pas apporté de changement par rapport au témoin.

En conclusion, il semble ainsi que l'action inhibitrice des antibiotiques vis-à-vis de la trypsine ne s'exerce qu'à des concentrations très élevées qui ne sont jamais atteintes même dans le tractus intestinal au cours du traitement par certains antibiotiques per os.

Pour la lipase pancréatique humaine, les fortes concentrations d'antibiotiques se sont également montrées inhibitrices, mais nous ne pouvons formuler de conclusions, n'ayant pu expérimenter avec les doses usuelles d'antibiotiques

CHAPITRE II

En dehors des études faites sur le pouvoir inhibiteur des antibiotiques vis-à-vis des enzymes digestifs animaux, de nombreux auteurs se sont attachés à découvrir une action possible de bactériostatiques sur divers autres enzymes animaux.

Employant du sérum sanguin humain, Jacobson et Azevedo [61] ont déterminé le pouvoir de la cholinesténase, en présence et en l'absence d'antibiotiques, par la méthode de Stedman et Stedman, modifiée par Glick : une solution acqueuse contenant 15 mg d'acétylocholine est laissée 30 à 37° C en présence de 0,5 ml de sérum. L'acide acétique formé a été titré de 10 minutes en 10 minutes par la soude 0,02 N, en présence de bleu de bromothymol. Les antibiotiques ont été employés en solutions aqueuses neutralisées, à la dose de 50 mg. pour 0,5 ml de sérum. Les auteurs ont ainsi montré que la cholinesterase du sérum humain était légèrement activée par l'Auréomycine, la Terramycine et l'Erythromycine. Par des études antérieures Mirabeau Cruz [28] avait vérifié l'augmentation d'activité de la cholinestérase de sérum humain et de sérum de cobaye, en présence de Pénicilline, ses conclusions n'étant cependant pas en accord avec celles de Frommel citées par Sevag [112]. Jacobson et Cruz rapportent enfin [60] une activation de la cholinestérase par la Streptomycine.

En 1954, Jacobson et Azevedo [62] ont étudié l'action des antibiotiques sur une uréase sèche. Ils mélangeaient 0,5 ml d'une solution à 1 p. 100 d'uréase dans du tampon phosphate à pH 6,9, à un volume égal d'une solution d'urée à 1 p. 100, 10 mg de l'antibiotique et complétaient à 8 ml avec de l'eau.

Après 30 minutes à 37° C, l'activité enzymatique était déterminée en dosant l'ion ammonium par nesslérisation des liqueurs sans déprotéïnisation préalable. Les auteurs ont ainsi montré que l'Erythromycine inhibait l'uréase à la dose de 10 et 5 mg. L'Auréomycine inhibitrice à 10 mg est légèrement activatrice à 5 mg. La Terramycine est toujours légèrement activatrice.

Pour notre part, nous avons étudié l'action des antibiotiques sur l'activité des phosphatases alcalines du sérum humain. La libération de phosphate à partir de l'acide α glycérophosphorique et du α glucose — 1 — phosphate dipotassique par les phosphatases de l'intestin de bœuf, en présence de Streptomycine avait montré une inhibition légère de l'activité enzymatique à Barker et coll. [12]. Nous avons utilisé, pour le titrage des phosphatases alcalines humaines, la méthode de King et Armstrong [66].

Préparation du substrat : 2,18 g. de Phényl-phosphate disodique sont dissouts dans un 1 litre d'eau distillée et portés rapidement à l'ébullition. On refroidit immédiatement. On ajoute quelques gouttes de chloroforme. On conserve en glacière.

Tampon alcalin : on dissout,

CO_3Na_2 anhydre	6,36 g.
CO_3NaH	3,36 g.

dans 1 litre d'eau distillée. On conserve en glacière après avoir ajouté quelques gouttes de chloroforme.

Solution de carbonate de soude CO_3Na_2 à 25 p. 100.
Réactif de Folin et Ciocalteu.

On dissout, dans 1 flacon à col rodé :

Tungstate de soude	20 g.
Molybdate de soude	5 g.

dans 140 g d'eau distillée puis on ajoute :

PO_4H_3 (densité : 1,75)	10 ml.
ClH concentré	20 ml.

On adapte au col rodé, un réfrigérateur à reflux. On porte à ébullition que l'on maintient pendant 10 heures.

A la solution refroidie, on ajoute :

SO_4Li ..... 30 g.

On filtre. Pour l'emploi, on dilue au 1/3

Solution étalon :

Solution de phénol titré ..... 5 ml.
Liqueur de Folin au 1/3 ..... 100 ml.
Eau distillée q.s.p. ..... 500 ml.

conservée en glacière.

Notre mode opératoire fut le suivant :

Dans quatre tubes numérotés, 1 — 2 — 3 — 4, on place :

Substrat ..... 2 ml.
Tampon alcalin ..... 2 ml.

Dans les tubes 3 et 4, on met l'antibiotique, soit en disques, servant pour la détermination de la sensibilité des germes sur boites de Pétri, soit en poudre.

Les 4 tubes sont laissés 3 minutes dans un bain-marie à 37° C. On ajoute alors dans les tubes 2 et 4, 0,2 ml de sérum. On laisse dans le bain-marie pendant 15 minutes.

Au bout de ce temps, 0,2 ml de sérum sont ajoutés dans les 2 tubes témoins 1 et 3. Immédiatement, on verse dans les 4 tubes 1,8 ml de liqueur de Folin et Ciocalteu, diluée au 1/3. On centrifuge à 3.000 tours pendant 10 minutes.

On prélève 4 ml de liquide surnageant dans chaque tube et l'on ajoute 1 ml de la solution de $CO^3\ Na^2$. On prépare le tube étalon :

Etalon phénol ..... 4 ml.
Sol. CO_3Na_2 ..... 1 ml.

On laisse la coloration bleue se développer à la température du laboratoire pendant 24 heures.

La lecture est alors faite au colorimètre de Dubosq et les chiffres sont exprimés en unités-King.

Le tube 3, représentant le témoin-antibiotique, est absolument nécessaire car, surtout avec les Tétracyclines, l'addition

de l'antibiotique perturbe la coloration des liqueurs, ce qui n'a rien d'étonnant, le réactif étant encore plus sensible avec les polyphénols (Tétracyclines) qu'avec les monophénols; les Tétracyclines obligent donc à faire des dilutions avant la lecture, le milieu devenant trop fortement coloré, à plus forte raison, lorsque l'on a affaire à des sérums dont l'activité phosphatasique est augmentée. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Témoins	Streptomycine			Auréomycine	Tétracycline	Viomycine
	1 disq.	2 disq.	5 mg	1 disque	2 mg	5 mg
6 unités	6			6		
9 unités		9				
43 unités			43			33
90 unités					70	

Les sérums normaux ont des activités phosphatasiques assez basses et une légère inactivation risque de passer inaperçue.

Les quelques résultats que nous avons eus montrent que de petites quantités d'antibiotiques n'ont aucune action sur les phosphatases alcalines, alors que d'énormes quantités, 2 à 5 mg. pour 0,2 ml de sérum, peuvent se montrer inhibitrices dans le cas de la Tétracycline et de la Viomycine.

Il est ainsi hors de doute que les concentrations thérapeutiques d'antibiotiques atteintes dans le sérum, n'ont aucune influence sur l'activité phosphatasique.

CHAPITRE III

ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LA PAPAINE

Le problème qui se posait tout d'abord était celui du mode opératoire. En effet le titrage officiel de la papaïne, selon la méthode du Codex, se pratique en faisant la pesée des extraits secs de fibrinolyse. Cette fibrinolyse est effectuée en milieu purement aqueux et à 70° C. Or, notre but était de comparer l'action des antibiotiques sur la fibrinolyse. Nous avons donc été amenés à employer le processus suivant [7].

Dans les erlenmeyers parfaitement propres et séchés à l'étuve à 100° C, nous mettons :

2,50 g. de fibrine de porc étalon sèche;
50 mg. de papaïne tamisée.

Nous ajoutons alors une solution tampon aux phosphates :

PO_4H_2K, M/15 ..... 370 ml.
PO_4HNa_2, M/15 ..... 630 ml. } pH : 7,0.

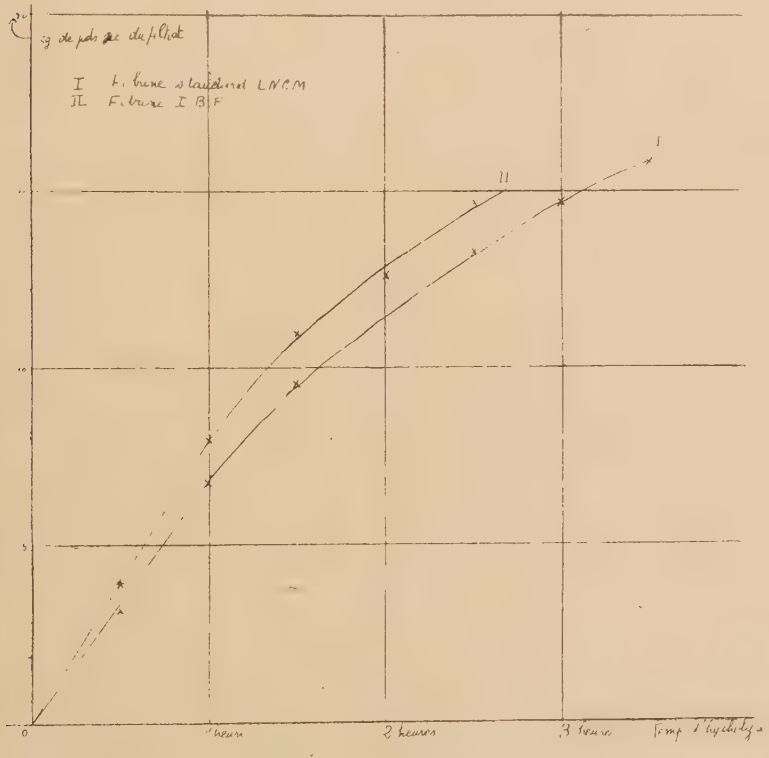
Cette solution est préalablement portée à 40° C et versée à raison de 50 ml par erlenmeyer. Les flacons sont bouchés par des bouchons de caoutchouc, agités et portés immédiatement dans une étuve à 40° C où nous les laissons pendant des temps variables. Tous les quarts d'heure nous agitons fortement.

Le temps désiré étant obtenu, le contenu des flacons est filtré le plus rapidement possible, pour que la protéolyse ne se poursuive pas, sur filtre Prat-Dumas moyen n° 19.

Nous prélevons 10 ml du filtrat avec une pipette à double trait et nous en faisons l'extrait sec dans des cuves tarrées, pendant 12 heures dans une étuve à 100° C. Les pesées se font sur les cuves refroidies à l'abri de l'humidité.

Nous avons pu ainsi tracer des courbes d'hydrolyse chaque point correspondant à la moyenne de nombreux chiffres (voir courbe). Nous avons choisi la méthode pondérale, plutôt que l'une des nombreuses autres méthodes de titrage des protéolyses [6], comme étant la plus fidèle et surtout la plus précise. La fibrine est un excellent substrat puisqu'elle est insoluble; de plus c'est surtout une fibrinolyse que l'on attend, en thérapeutique locale, de la part de la papaïne. Nous avons donc été amenés à pratiquer cette fibrinolyse à pH : 7,0, pH optimum d'action de la papaïne sur ce substrat [6]. Ainsi l'action éventuelle d'autres substances mises dans le milieu réactif ne pouvait dépendre d'un simple effet sur le pH. La température de 40° C, plus physiologique que les classiques 70° C, nous a obligés à augmenter le poids de papaïne mis en réaction : 50 mg au lieu de 15 mg, pour conserver un extrait sec d'un poids suffisant. Mais nous conservons toujours un très grand excès de substrat, indispensable à une bonne mesure de la vitesse de réaction. Nous avons effectué divers essais à « blanc » et en particulier un essai fibrine-tampon, ce qui nous a permis de constater que sur les trois marques de fibrine que nous avons employées la Fibrine de porc Standard « Graves », la Fibrine de porc standard « Industrie Biologique Française » et la Fibrine de porc standard du LNCM, seule cette dernière ne donnait aucun résidu dans le filtrat, même après 24 heures de contact à 40° avec le tampon. Les deux autres fibrines se lysent lentement dans les mêmes conditions. Cette remarque devrait inciter à la prudence dans l'interprétation de certains titrages officiels, lorsque les opérateurs ne font pas de « blanc fibrine » et ne spécifient pas la marque de fibrine employée. Les titres de papaïne peuvent en être notablement modifiés. De plus, en établissant les courbes de fibrinolyse nous avons obtenu des courbes de même allure, mais légèrement décalées suivant la fibrine employée. L'analyse de ces courbes montre une partie initiale linéaire jusqu'au temps de 1 heure à 1 heure 1/4.

Dans cette partie de la courbe, l'action de l'enzyme sur son substrat est mono-moléculaire. Ainsi les résultats ne peuvent-ils être valablement comparés d'une courbe à l'autre que dans cette partie de la courbe [26]. Les rapports mathématiques existant au-delà entre différentes courbes ne sont plus simples et deviennent difficilement transposables. Nous proposons donc finalement un titrage de la papaïne dans les conditions quasi physiologiques définies plus haut avec un temps de protéolyse de *une heure*.



Sur ces bases nous avons entrepris l'étude de l'action des antibiotiques sur la fibrinolyse papaïnique. Nous nous sommes servis de papaïne tamisée titrant 84 par la méthode

classique du Codex. Les antibiotiques ont été ajoutés à des doses variables, avant l'addition du tampon. Les hydrolyses ont été conduites comme ci-dessus pendant 1 heure et prolongées au-delà de deux heures. Des « blancs » variés ont été effectués. Ceci nous a permis de constater :

a) qu'aucun antibiotique employé n'était fibrinolytique par lui-même;

b) que les antibiotiques étaient variablement absorbés par le substrat et le filtre;

c) que la papaïne employée n'était pas entièrement soluble, qu'elle était absorbée par le substrat et aussi par le filtre.

Les résultats que nous donnons dans le tableau A. représentent le poids de fibrinolysat effectif: du poids brut de l'extrait sec, nous avons en effet retranché : *a*) le poids de l'extrait sec du tampon; *b*) le poids de papaïne subsistant ainsi que celui de l'antibiotique, tout ayant été calculé expérimentalement, aucun poids en effet ne correspondant aux poids théoriquement calculés. Les chiffres du tableau représentent des milligrammes.

Résultat. — Il ressort de ce tableau que les Tétracyclines, l'Auréomycine en particulier et à un moindre degré, la Bacitracine et le Chloramphénicol, ont une action inhibitrice sur la fibrinolyse papaïnique. Le groupe de la Streptomycine n'a aucune action. Nous avons essayé de sensibiliser le processus en laissant une heure en contact à 40° C, 20 mg. d'Auréomycine avec la papaïne en milieu tamponné; secondairement nous avons ajouté la fibrine et laissé la fibrinolyse se faire pendant une heure.

L'extrait sec du témoin était de 34 mg.

Celui où il y avait l'Auréomycine, de 30 mg.

L'inhibition n'est pas très nette. Pour rendre la réaction plus sensible, nous avons laissé en contact les antibiotiques et la papaïne en milieu tamponné pendant 24 heures à 40° C. Ceci nous a permis de constater, en faisant secondairement

la fibrinolyse, que la papaïne du témoin avait perdu une grande partie de son pouvoir :

Après 24 heures d'étuve à 40° C sans substrat :

Témoin normal	80	mg. d'extrait sec.
Témoin	20	mg. d'extrait sec.
Auréomycine (50 mg.)	0,3	mg. d'extrait sec.
Streptomycine (50 mg.)	6	mg. d'extrait sec.
Chloramphénicol (50 mg.) ..	13	mg. d'extrait sec.

Nous avons une inhibition presque totale par l'Auréomycine. La Streptomycine se montre aussi inhibitrice dans ces conditions. Nous remarquons cependant que toutes ces expériences ont été effectuées avec des doses très importantes d'antibiotique. Pour avoir des résultats probants nous avons dû employer des poids identiques d'antibiotique et d'enzyme. Les faibles doses ne donnent aucune inhibition.

Ces résultats étaient en contradiction avec ceux obtenus par J. Coste [25]. Cet auteur, étudiant la désintégration de caillots de sang par la papaïne, trouvait une inhibition très importante du phénomène enzymatique par des concentrations de 50 g/ml de Terramycine, Auréomycine et Chloramphénicol. La Streptomycine ne devenait inhibitrice qu'à la concentration de 500 g/ml. La Pénicilline n'avait aucune action. Ces concentrations étaient bien inférieures à celles de la papaïne dans ces solutions, celles-ci variant de 6 à 0,12 p. 100. Voulant vérifier ces faits nous avons employé la technique suivante : les caillots dont nous nous sommes servis étaient des caillots obtenus au cours du titrage de la prothrombine : 1/10 ml de plasma oxalaté et 2/10 ml de thromboplastine « Biolyon ». Ces caillots, bien calibrés, étaient lavés immédiatement à l'eau distillée et laissés 24 heures à la glacière dans de l'eau distillée. Le lendemain nous choisissions les seuls caillots non lysés et provenant de sangs dont les taux de prothrombine étaient semblables.

La papaïne employée était une papaïne hydrosoluble titrant 400.

TABLEAU A : Les résultats sont donnés en mg de poids sec de filtrat correspondant au seul produit de protéolyse.

PROTEOLYSE DE LA FIBRINE I.B.F.			
TEMPS DE MOTEOLYSE		1 heure	2 heures
TEMOINS		80	125
Tétracycline (Sanclomycine)	5 mg		
	20 mg.		
	50 mg.	64	
Terramycine	5 mg.		
	50 mg.		111
Auréomycine	20 mg.		
	50 mg	55	110
Streptomycine	10 mg.		
	20 mg		
	50 mg.		124
Dihydrostreptomycine	20 mg.		
	50 mg.	80	
Bacitracine	10 mg.		
	20 mg.		
	50 mg		113
Spiramycine (Rovamycine)	10 mg.		123
	50 mg.		122
Chloramphenicol (Tifomycine)	50 mg.		115
Magnamycine	50 mg.		119

PROTEOLYSE DE LA FIBRINE L.N.C.M.

TEMPS DE MOTEOLYSE		1 heure	2 heures
TEMOINS		68	115
Tétracycline (Sanclomycine)	5 mg		115
	20 mg.		113
	50 mg.		109
Terramycine	5 mg.		115
	50 mg.		110
Auréomycine	20 mg.	70	104
	50 mg.		100
Streptomycine	10 mg.		113
	20 mg.		112
	50 mg.		
Dihydrostreptomycine	20 mg		129
	50 mg.		117
Bacitracine	10 mg.		111
	20 mg.		110
	50 mg.		
Spiramycine (Rovamycine)	10 mg.		
	50 mg.		
Chloramphenicol (Tifomycine)	50 mg.		
Magnamycine	50 mg.		

Les solutions suivantes étaient préparées extemporanément :

Solution de papaïne à 2 p. 100 } dans le tampon aux
Solution d'antibiotique à 0,2 p. 100 } phosphates à pH : 7,0.

Puis nous préparions les séries suivantes :

3 tubes témoins avec le caillot dans 2 ml. de tampon.

3 tubes avec caillot, 1 ml. de tampon, 1 ml. solution papaïne.

3 tubes avec caillot, 1 ml. de solution d'antibiotique, et 1 ml. de solution de papaïne.

Nous avions ainsi des garanties certaines au cas où les caillots se seraient lysés sans le secours de la papaïne (ce qui ne manque de se produire si l'expérience se prolonge) ou si les caillots n'avaient pas été absolument semblables

Nous avons ainsi étudié l'action de l'Auréomycine, Terramycine, Tétracycline, Streptomycine, Spiramycine, Viomycine et Pénicilline (20.000 U/ ml.). La désintégration des caillots s'est toujours faite en 1 heure 1/2, et sensiblement à la même vitesse dans tous les tubes, les témoins sans papaïne restant absolument intacts.

Ainsi, lorsqu'un certain rapport entre la papaïne et les antibiotiques est respecté, ceux-ci n'ont aucun effet inhibiteur. J. Coste a démontré de plus, que les antibiotiques n'avaient aucune action sur le pouvoir gélatinolytique de la papaïne.

1° A la suite de ces résultats, nous n'avons essayé de comprendre l action des fortes concentrations de certains antibiotiques sur la papaïne. Cette action n'est pas une question de pH, puisque des mesures multiples faites sur les filtrats en fin de fibrinolyse n'ont donné que des écarts de 0,1 par rapport au chiffre du pH de départ. Une acidification aussi légère ne peut rendre compte des résultats.

2° Nous avons alors pensé à la possibilité d'une inhibition de la réaction enzymatique par un pouvoir chélatant éventuel des antibiotiques. Il est en effet démontré aujourd'hui que les Tétracyclines ont un pouvoir particulièrement élevé de se

complexer avec les cations métalliques, en particulier le calcium et le magnésium [1 et 101]. On explique d'ailleurs certaines inhibitions provoquées par ce groupe d'antibiotiques par ce pouvoir de priver une réaction enzymatique de ses ions indispensables ou du moins favorisants. Balls et Janson [10] rapportent de nombreux travaux tendant à prouver le rôle des ions métalliques dans les réactions enzymatiques. Ils montrent ainsi le rôle protecteur, en particulier, de l'ion calcium sur la trypsine et plusieurs protéases bactériennes. Les réactifs complexant le calcium, tels que fluorures, citrates, éthylène-diamine tétracétate de sodium inactivent les préparations cellulaires des protéinases. Yon [136] cependant trouve au contraire que les ions Ca++, Mg++ et NH4+ entraînent une inhibition de certaines réactions de protéolyse. Kimmel et Smith [63] étudiant la mercuripapaïne cristallisée, démontre que celle-ci est inactive, mais activée par les agents chélatants, comme le versène qui lui enlève son métal. La papaïne dont nous nous servions contenait [6].

Ca ..... 2,01 p. 100 de papaïne sèche.
Mg ..... 0,15 p. 100 de papaïne sèche.

Si cette teneur élevée en ces éléments est à rapprocher des conceptions de Roche [104] concernant les effecteurs métalliques « valentiels » des cœnzymes, Balls, rejoignant Kimmel, signale que sa papaïne cristallisée ne contient aucun effecteur métallique. Ainsi, loin d'inhiber l'action fibrinolytique de la papaïne, les Tetracyclines, en fixant les ions métalliques, auraient dû favoriser cette action. Une action sur les ions métalliques est ainsi à écarter.

3° Bacq et Fischer [9], bloquant les groupements SH de diverses protéases, ont diminué grandement leur pouvoir. Murray [83], appliquant ce principe à la papaïne, arrivait à inhiber complètement son action enzymatique. Reprenant ces travaux, Suzanne Régnier [102] a étudié l'action de la ninhydrine sur les groupements sulfhydryles de diverses protéases. Elle a montré que la ninhydrine bloquait, du moins en grande partie, les groupements SH et a défini les conditions

expérimentales de ce blocage. Etudiant ensuite le pouvoir protéolytique des protéases à groupements sulfhydryles ainsi bloqués, elle conclut au rôle essentiel joué par ces groupements dans le cas de la papaïne; ces groupements seraient défavorables pour la pepsine, indifférents dans le cas de la trypsine. Smith et coll. [115] ont déduit de leurs expériences sur la papaïne cristallisée qu'il y avait deux groupements —SH par molécule de papaïne et que seule la papaïne à groupe SH libres était active. Ils expliquent l'activation de cet enzyme par les réducteurs par le fait que ceux-ci progent ou libèrent ces groupements actifs. Nous avons vu aux premiers chapitres que la Pénicilline et la Streptomycine pouvaient se lier directement aux groupes SH de la cystéine. Mais ceux-ci n'ont en aucune façon inhibé la papaïne. Cette action des antibiotiques sur de tels groupes a d'ailleurs été fortement mise en doute. L'action du Chloramphénicol peut s'expliquer par son pouvoir oxydant : il cycliserait les molécules de papaïne par leurs groupes SH qui donneraient des formes —S—S. Une action semblable se passe peut être avec les Tétracyclines, sans que l'on ait de preuve formelle de cette action.

4° Reste enfin la possibilité d'une absorption de l'antibiotique sur le substrat, ou l'enzyme, empêchant ainsi la fixation de l'un sur l'autre. Deux antibiotiques ont ainsi le pouvoir de former des complexes électrovalentiels avec les protéines : la Streptomycine et le Chloramphénicol. Un poids moléculaire de 20.700 trouvé par Kimmel [115] pour la papaïne est en accord avec la possibilité de fixation de molécules aussi petites que celles des antibiotiques. Mais ce n'est ici qu'une hypothèse.

De tous les modes d'action possible de l'Auréomycine et du Chloramphénicol sur la papaïne, nous retiendrons surtout le pouvoir oxydant de ces deux antibiotiques qui cycliseraient les molécules de papaïne comme le montre le schéma suivant :

ou : 2 SH - papaïne -SH⟺SH - papaïne -S-S- papaïne - SH

Cette dernière formule expliquant peut être que l'on ne peut détruire complètement l'activité fibrinolytique de l'enzyme, certains groupements sulfhydryles restants à la disposition du substrat.

CHAPITRE IV

ASSOCIATION PROTEASES-ENZYMES

Si l'Antiquité, empiriquement, connaissait l'action thérapeutique locale de certains fruits, papaye, figue, ananas, ce n'est que depuis peu qu'une étude méthodique des propriétés de ces fruits a été entreprise. Ceux-ci ont en effet en commun des systèmes protéolytiques dont le mieux connu est la papaïne, extraite du Carica papaya Depuis, d'autres protéases sont entrées dans la thérapeutique : animale, comme la trypsine, microbiennes comme la Streptokinase et la Streptodornase [106 et 93]. Si nous avons employé ces dernières dans la présente étude, nous avons cependant mis l'accent sur la papaïne.

Cette dernière a été étudiée à Bordeaux depuis 1948 par Rigaud, Babin et J. Brisou. Ils ont étudié les propriétés protéolytiques de celle-ci, ses effets sur les germes en culture et son emploi en thérapeutique locale. Trois thèses ont déjà vu le jour à son sujet : celle de Peduchon en 1949 [92], de Coste en 1953 [25] celle de Demenge en 1954 [29]. Depuis, de nombreuses communications ont été faites montrant les très beaux résultats qu'on peut en attendre : Rigaud, J. Brisou, Babin [103] et Ravina et Wenger [97]. On attend de son application une lyse des différentes protéïnes, aussi bien la fibrine que les noyaux et protoplasmes des cellules mortes et les structures collagènes; la papaïne se montre aussi polyvalente que le complexe enzymatique de Clostridium histolyticum. Mais son pouvoir ne s'arrête pas là. En effet, Babin [6] a rapporté le pouvoir bactériostatique de la papaïne vis-à-vis de différents germes.

En employant une solution à 10 p. 100 de papaïne titrant 84 tyndallisée à 56° C. pendant 35 minutes, ont peut retarder de 24 heures une culture sur gelose de Staphylocoque doré, avec une concentration de 1,4 p. 100 de papaïne dans le milieu. Une fois la croissance amorcée, elle se déroule normalement. Les colonies et les germes conservent leur morphologie habituelle. En milieu liquide, bouillon ordinaire, le témoin pousse en 16 heures, une concentration de 1,4 p. 100 et 1,8 p. 100 de papaïne retarde la culture de 48 heures; une concentration de 2,5 p. 100 la retarde de 72 heures. Mais aux fortes concentrations la papaïne acidifie le milieu. Des expériences ultérieures faites, en bouillon citraté ajusté à pH : 7,0 avec une concentration de 1 p. 100 de papaïne, sur divers germes, ont donné les résultats suivants TABLEAU I

GERMES	24 h.	48 h.	60 h.	72 h.	96 h.
Entérocoque	+	+	+ + (S)	+ +	+ +
Staphylocoque doré	0	0	0	0	+
Abortus suis	0	0	0	0	0

Culture de différents germes en présence de papaïne.

+ = Culture.
++ = Culture abondante.
S = Smooth.
R = Rough.

Les mêmes expériences pratiquées sur les Shigellae ont donné les résultats suivants : TABLEAU II

GERMES		8 h.	24 h.	36 h.	48 h.
Sh. dysenteriae		0	0	0	0
Flexner	V	0	0	0	0
»	W	0	0	0	0
»	X	0	0	0	0
»	Y	0	0	0	0
»	Z	0	0	0	0

Les expériences faites sur les Salmonellae donnent :

TABLEAU III

GERMES	20 h.	24 h.	48 h.
Salmonella typhi	0	0	0
Para A	0	0	+
Para B	+ +	+ +	+ +
Para C	0	±	± (R)
Garther	+	+ +	+ +
Aertrycke	±	+ +	+ +

Des essais ont été faits sur une souche d'Entérocoque en milieu synthétique. Ce milieu était composé comme suit : milieu de Stéphenson :

$PO_4(NH_4)H_2$, H_2O	.....	1.000 l.
ClNa	.....	1 g.
SO_4FE, 7 H^2O	.....	4 g.
PO_4KH_2	.....	0,3 g.
SO_4Mg, 7 H^2O	.....	0,4 g.
Eau distillée	..... q. s. p.	0,7 g.

ajusté à pH : 7,0 avec NH_3.

A 10 ml de ce milieu, on ajoute 0,1 ml, d'une solution de glucose à 3 p. 100, 1 ml d'une solution à 0,2 p. 100 d'acide glutamique et 1 ml d'une solution de papaïne à 10 p. 100.

On ensemence un témoin et le tube d'expérience avec une culture d'Entérocoque et l'on suit la croissance du germe

en mesurant la densité optique du milieu au photomètre de Vernes.

Le pouvoir bactériostatique de la papaïne, vis-à-vis des germes en aérobiose se voit inversé et la papaïne devient au contraire un facteur favorable vis-à-vis des germes poussant en anaérobiose (6) ce qui a d'ailleurs fait proposer son addition dans la préparation d'un milieu d'isolement des germes anaérobies. Ainsi pourrait-on penser qu'il serait dangereux d'employer un tel enzyme dans le traitement de certaines plaies pouvant contenir des germes anaérobies. Mais l'association d'antibiotiques pallie efficacement à cet inconvénient (97). Nous avons, par le fait même été amenés à étudier cette association enzyme-antibiotiques. Dans le chapitre précédent nous avons fait état de l'action des bactériostatiques sur la protéase. Nous discuterons ici l'action éventuelle de la papaïne et de quelques autres protéases, sur la bactériostase due aux antibiotiques.

Pour nos expériences, nous avons utilisé une méthode très simple : nous avons testé les germes par la méthode des disques en boîte de Petri sur bouillon gélosé ordinaire additionné ou non de l'enzyme. A l'Ecole principale du Service de Santé de la Marine et de la France d'Outre-mer, nous avons isolé différentes souches de germes divers ; le nom de ces souches ne correspond donc qu'à une notation personnelle.

Pour commencer par la papaïne : nous ajoutons aux milieux de culture de la papaïne lyophylisée titrant 400 à

raison de 50 mg pour 25 ml de milieu, soit une dilution de 0,2 pour 100. Chaque boîte a son témoin correspondant. On ensemence avec une goutte d'une dilution au centième d'une culture de 24 heures. On procède à la pose des disques contenant l'antibiotique. Les tests faits avec les sulfamides sont pratiqués sur les milieux spéciaux préconisés par l'Institut Pasteur de Paris. La lecture des résultats s'effectue 18 heures après la mise en route des expériences. Dans cette série d'expériences, nous testons ainsi (tableau IV) :

Une souche d'Escherichia coli ..	Coli R.
Deux souches de Staphylocoques.	Staphylo 1
	Staphylo Oddou.
Deux souches de Pseudomonas æruginosa	Souche 1
	souche Gaulhier.

Ce qui frappe tout d'abord, c'est l'état clairsemé des colonies des trois premières souches citées, dans les boîtes contenant de la papaïne. La croissance de la souche Oddou de Staphylocoque est même complètement inhibée. Il faut cependant reconnaître que cette souche se montre très fragile, extrêmement sensible à certains antibiotiques. Ces trois souches venaient d'être isolées lorsque nous les avons testées. La papaïne semble bien sensibiliser ces germes à certains antibiotiques. Les souches de Pyocyaniques se montrent très résistantes, aussi bien en présence qu'en l'absence d'enzyme; seule la souche 1 est sensibilisée à deux sulfamides. Mais ces souches étaient isolées depuis 1 an et plus.

TABLEAU IV

Disques	E. coli. R.		Staphylo. 1		Staphylo. Od.		Pyocyanique 1		Pyocyanique G	
	Papaïne 50 mg.	Témoin	Papaïne 50 mg.	Témoin	Papaïne 50 mg.	Témoin	Papaïne 50 mg.	Témoin	Papaïne 50 mg.	Témoin
Péni.	10	10	32	25	*					
Strepto.	35	30	31	22			10	10	10	10
Chloram.	11	11	10	10		10	17	21	10	13
Auréo.	26	18	31	23			10	10	10	10
Terra.	35	19	32	30			13	13	10	10
Tétrac.	34	20	32	26			12	14	10	12
Erythro.	11	10	+	22			11	11	10	10
Spira.	12	10	+	26			10	10	10	11
Baci	11	11	+	21			10	10	10	12
Néo.	16	16	+	13		14	11	11	10	12
Mycina	13	10	+	21			10	10	10	10
Framyc.	14	14	+	14		18	11	11	10	10
Furadoï.							10	10	10	10
A							20	15	10	10
B							17	10	10	10
C							10	10	10	10
D							12	10	10	10

Les résultats indiqués dans ce tableau et les suivants donnent en millimètres le diamètre du cercle de bactériostase : le chiffre 10 est exactement le diamètre d'un disque d'antibiotique. + : 4 colonies éparses très loin de toute pastille d'antibiotique : sensibilisation maxima.

* : Aucune colonie n'a poussé sur les boîtes contenant la papaïne. Sur les boîtes témoins on ne notait que quel-

Nous reprenons l'expérience sur deux souches fraîchement isolées de Staphyloccus aureus, la souche Bru et la souche G. Nous employons de la papaïne seulement purifiée, en mettant des doses croissantes allant de 100 mg à 500 mg pour les 25 ml de milieu. De faibles concentrations de papaïne opacifient le milieu, si bien que les fortes doses gênent la lecture des anneaux de bactériostase. Le *tableau V* nous montre qu'il n'y a pas grande différence entre les taux de bactériostase chez le témoin et aux différentes concentrations de papaïne. Mais la papaïne employée, bien que purifiée, contient certainement des substances qui par elles-mêmes peuvent contrecarrer l'action de la papaïne ou activer la croissance des germes.

La première expérience faite sur le staphylocoque souche 1 est reprise en présence de 50 mg de Trypsine cristallisée (Martinet) par boîte de 25 ml. *Le tableau VI* nous montre les résultats à peu près analogues, quoiqu'avec des activations plus faibles, à celles obtenues avec la papaïne lyophilisée.

Les mêmes manipulations sont faites avec la Dornokinase (Diamant). On dilue le contenu d'un flacon de Dorkinase dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Puis, on place 1 ml de cette solution par boîte de Pétri contenant 25 ml de milieu. On a ainsi 4.000 unités de Streptodornase pour 100 ml. Les résultats obtenus avec la souche R d'E. coli et la souche B de Staphylocoque doré ne montrent aucune différence avec les témoins (*Tableau VII*). Ainsi la papaïne est capable de sensibiliser certains germes fraîchement isolés à l'action de quelques antibiotiques. Si nous n'avons pas réussi à forcer un germe insensible, J. Brisou, dans un travail inédit a atteint ce but, rendant sensible à des antibiotiques des germes résistants à ceux-ci.

L'explication d'un tel mécanisme n'est pas encore élucidé. Nous retiendrons la possibilité de l'attaque, par les protéases de la couche externe des bactéries. Ainsi Morris et

TABLEAU V

DISQUES		Péni.	Strepto.	Chloram.	Auréo.	Terra.	Fura.	Erythro	Spira.	Baci.	Néo.	Magna.	Framy.
Staphylo. Souche B.	Témoin	27	28	36	27	27	33	26	26	20	15	25	15
	P. 150 mg.	27	23	36	27	30	32	26	23	20	16	27	16
	P. 200 mg.	28	26	38	30	36	38	28	26	20	27	27	21
	P. 500 mg.	30	25	37	28	31	37	23	25	20	21	24	23
Staphylo. Souche G.	Témoin	18	10	28	10	10	10	30	28	32	18	27	19
	P. 150 mg.	19	10	28	10	10	10	28	23	33	20	28	20
	P. 200 mg.	12	10	30	10	10	10	32	26	35	30	27	28

TABLEAU VI

DISQUES		Péni.	Strepto.	Chloram.	Auréo.	Terra.	Tétra.	Erythro.	Spira.	Baci.	Néo.	Magna.	Framy.
Staphylo. Souche 1.	Témoin	31	22	10	22	25	29	28	28	22	12	28	13
	Trypsine 50 mg.	35	25	10	26	32	34	28	24	18	13	28	13

TABLEAU VII

DISQUES		Péni.	Strepto.	Chloram.	Auréo.	Terra.	Tétra.	Tétra.	Erythro.	Spira.	Baci.	Néo.	Magna.	Framy.	A	B	C	D
Coli. A	Tém.	21	34	16	20	18	21	10	16	13	12	16	12	28	28	28	29	
	Dor.	24	34	18	20	23	21	10	10	10	13	12	12	30	25	35	28	
Staph. B	Tém.	28	30	35	22	30	32		34	32	21	13	30	15				
	Dor.	28	33	38	28	32	35		28	30	25	18	25	18				

coll. [82] ayant trouvé que la trypsine et la papaïne sensibilisaient des Streptocoques hémolytiques à la phagocytose des globules blancs humains, pensaient que ces enzymes détruisaient la protéïne M des Streptocoques, laquelle se situe entre la membrane cellulaire et la capsule, c'est-à-dire en surface. Des résultats semblables ont été collectés par Bock [17] qui sensibilisait les Mycobactéries aux antibiotiques par la lipase pancréatique.

Ainsi, les enzymes protéolytiques, la papaïne surtout, se montrent efficaces dans les traitements locaux par divers mécanismes.

1° Action lytique sur diverses protéïnes, fibrine et collagène en particulier, empêchant les germes de se retrancher dans des repaires fibreux, et permettant un nettoyage rapide de la plaie.

2° Action bactériostatique propre, les concentrations employées en thérapeutique locale permettant cette action.

3° Sensibilisation des germes à la phagocytose.

4° Sensibilisation des germes à l'action des antibiotiques.

Cette étude montre l'intérêt de l'application clinique de ces protéases, la papaïne restant nettement la plus active, tant au point de vue de son large spectre de protéolyse qu'au point de vue de l'activité bactério-statique qui lui est propre.

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de notre exposé, nous avons, dans une première partie, fait ressortir ce qui était important dans le mécanisme probable d'action des principaux antibiotiques et leur interférence vis-à-vis de certains systèmes enzymatiques. Nous avons vu que la Pénicilline et la Streptomycine, à quelques différences près, agissaient surtout au niveau des acides nucléiques, et bloquaient certaines réactions indispensables au bon fonctionnement de la cellule microbienne, telles que la condensation acide pyruvique-oxalacétate et la réaction de Stickland. Passant au Chloramphénicol et aux Tétracyclines, nous avons montré que ces corps intervenaient surtout dans les réactions d'oxydo-réduction et peut-être aussi par un antagonisme vis-à-vis de certaines vitamines.

Dans la seconde partie, après un rappel des travaux spéciaux faits sur le sujet, nous avons donné les résultats de l'action de plusieurs antibiotiques sur l'amylase salivaire, la pepsine stomacale, la trypsine et la lipase pancréatique, et la phosphatase alcaline du sérum humain, montrant que seules de grosses doses d'antibiotiques pouvaient inhiber partiellement ces ferments. Les études comparatives faites sur les mêmes systèmes enzymatiques appartenant aux bactéries et aux cellules de métazoaires ont montré à divers auteurs que ces derniers résistent toujours mieux à l'action nocive des bactériostatiques. Une grosse différence a aussi été constatée entre l'action des antibiotiques in vivo et in vitro. L'animal se défend mieux et l'antibiotique a certainement beaucoup de difficultés pour atteindre les enzymes dans les micro-organites cellulaires tels que les mitochondries. L'étude de l'action de quelques bactériostatiques sur la papaïne,

enzyme spécialement actif par ses groupements SH, nous a montré que seuls le Chloramphénicol et surtout l'Auréomycine provoquaient une inactivation notable, et encore à de fortes doses. Si ces antibiotiques n'agissent pas directement sur les groupes sulfhydryles, il est fort probable qu'ils facilitent ou provoquent la formation interne de liaisons disulfures dans la molécule de l'enzyme, bloquant ainsi ses groupements actifs.

Dans un dernier chapitre enfin, nous avons étudié le renforcement éventuel de l'action des antibiotiques sur les germes en croissance en leur associant des enzymes protéolytiques. Nous avons conclu à une synergie certaine dans quelques cas, en particulier dans celui de germes fraîchement isolés. Il est acquis que ces enzymes, la papaïne au premier plan, ont apporté une grosse amélioration dans le traitement de certaines affections telles qu'anthrax, fistules osseuses, escarres, etc... Leur association avec des antibiotiques divers permettra à l'avenir des résultats encore plus manifestes.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes Condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes Confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

VU :

Le Doyen :
R. SIGALAS.

Le Président de Thèse :
TAYEAU

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Bordeaux, le 4 Juillet 1957
le Recteur :
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Albert (A.), Rees (C. W.). — Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. *Nature* (London), **177**, n° 4505 3 mars 1956, p. 433-434.
2. Arora (K. L.), Krishna Murti (C. R.). — Etude de la relation entre l'inhibition des enzymes et l'action médicamenteuse. III. Action de certains antibiotiques sur les amylases. *J. Sc. indust. Res.* (India), 1952, **11-B**, n° 9, p. 383-386.
3. — Enzyme inhibition studies in relation to drug action. VIII. Action of certain antibacterial agents on the tricarboxylic acid cycle of Vibrio cholerae. *J. Sc. indust. Res.* (India), March 1955, **14-B**, n° 3, p. 66-69.
4. — *J. Sc. indust. Res.* (India), 1955, **14-C**, p. 6.
5. Artman (M.), Markenson (J.), Olitzki (A. L.). — Dihydrostreptomycin inhibition of cysteine desulfhydrase in cell free extracts of Escherichia coli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, déc. 1955, **90**, n° 3, p. 584-586.
6. Babin (R.-M.). — La papaïne : action enzymatique, son rôle dans la croissance et l'inhibition microbiennes. Thèse de docteur en Pharmacie, Bordeaux, 1953-1954.
7. Babin (R.-M.), Coustou (F.), Brisou (B.). — Titrage du mélange de poudre de papaïne et de bacitracine. *Bull. Soc. Pharm. Clermont-Ferrand*, 7 juin 1957.
8. Babin (R.), Mesnard (P.), Geyer (A.), Delmon (G.). — Sur le titrage des amylases salivaires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1957, **1**.
9. Bacq (Z.-M.), Fischer (P.). — *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 1943, 7, p. 373, et 8, p. 323.

10. Balls (A. K.), Jansen (E. F.). — Proteolytic enzymes. *Ann. Review of Biochem.*, 1952, **21**, p. 1-28.

11. Balls (A. K.), Lineweaver (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, **130**, p. 669.

12. Barker (S. A.), Bourne (E. J.), Stacey (M.), Ward (R. B.). — Effect of streptomycin on various enzymes responsible for syntheses and degradation of higher saccharides. *Nature* (London), 1955, **175**, n° 4448, p. 203-204.

13. Barkulis (I. L.). — Inhibition of anaerobic pyruvate dissimilation in Escherichia coli by dihydrostreptomycin. *J. Bact.*, 24, Febr. 1951, **61**, p. 435-436.

14. — Inhibition of anaerobic pyruvate metabolism of Escherichia coli by dihydrostreptomycin. *J. Bact.*, janv. 1953, **65**, n° 1, p. 337-343.

15. Baumgärtel (T.), Zahn (D.). — Ueber den Einfluss des Aureomycins auf Bakterielle und Cellulär Fermente. *Klin. Wchnschr.*, Oct. 1, 1951, **29**.

16. Bayliss (M.), Glick (D.), Siem (R. A.). — Demonstration of phosphatases and lipase in bacteria and true fungi by staining methods; effect of penicillin on phosphatase activity. *J. Bact.*, March 1948, **55**, p. 307-316.

17. Bock (G.). — Ueber den Einfluss verschiedener Stoffe auf die Aktivität von Antibioticis gegenüber Micobakterien. *Arch. Microbiol.*, 1956, **25**, n° 3, p 246-273, und *Naturwissenschaffen*, 1956, **43**, n° 11, p. 253-254.

18. Bolgert (M.), Le Sourd (M.). — Les abus actuels des antibiotiques et des corticoïdes en dermatologie. *Rev med. fr.*, 1956, **37**, n° 9, p. 515-521.

19. Burger (M.), Rokos (I.), Prokhazka (P.). — Effect of chlortetracycline on the activity of α-amylase. *Folia biol.* (Tchécosl.), 1956, **2**, n° 5, p. 320-326.

20. Cavallito (C. J.), Bailey (J. H.). — *Science*, 1944, **100**, p. 390.

21. Cavallito (C. J.), Chester (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, p. 29.

22. Chain (E.), Florey (H. W.), Gardner (A. D.), Heatley (N. G.), Jermings (M. A.), Orr Ewing (J.), Sanders (A. B.). — Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, 1940, **2**, p. 226.

23. Chow (B. F.), McKee (C. M.). — Inactivation of antibiotic activity of Penicillin by cysteïne hydrochloride; chemical aspects of inactivation. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, 1945, **58**, p. 175.

24. Collins (R. J.), Ellis (B.), Hansen (S. B.), MacKenzie (H. S.), Moualin (R. J.), Petrow (V.), Stephenson (O.), Sturgeon (B.). — Some observations on the structural requirements for antibiotic activity in the Chloramphenicol series. Part. II. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1952, **4**, p. 693-710.

25. Coste (J.). — Etude du traitement des suppurations par la papaïne. Thèse de doctorat en Médecine, Bordeaux, 1953.

26. Courtois (J.). — Le dosage des enzymes en chimie pathologique. *Exposés annuels de Biochimie médicale*, 1947, **7**,

27. Crone (A.), Münzebroc (K.). — Experimentelle Untersuchungen zur Pankreasfermentin Aktivierung mit Penicillin. *Klin. Wchnschr.*, 15 août 1951, **29**, p. 550-552.

28. Cruz (M.). — *Arch. Portug. Sc. Biol.*, 1946, Suppl., **9**, p. 23, et 1947, Suppl., **9**, p. 97.

29. Demenge (J.). — Traitement des escarres, plaies atones et fistules d'origine osseuse par la papaïne, papaïne-pénicilline. Thèse de doctorat en Médecine, Bordeaux, 1954.

30. Deuxième Congrès International de Biochimie. — Symposium sur le mode d'action des antibiotiques, 1952.

31. Divers auteurs. — Communication sur les abus des antibiotiques. *Bull. Mém. Soc. Hôp. Paris*, 1956, **72**, n° 26, p. 807-812.

32. Donatelli (L.), Galeotti-Flori (A.). — Pharmacologic study of streptomycin. *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, mai 1947, **23**, 578-580.

33. Dufrénoy (J.), Pratt (R.). — Cytochemical mechanism oxidation-reduction levels. *J. Bact.*, 1947, **53**, p. 657.

34. Duggar (B. M.) and coll. — Aureomycin, a new antibiotic. *Ann. N. Y. Ac. Sc.*, 1948, **51**, p. 175.

35. Ehrlich (J.), Bartz (Q. R.), Smith (R. M.), Goslyn (D. A.), Burkholder (P. R.). — Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science*, 1947, **106**, p. 417.

36. Finlay (A. C.), Hobby (G. L.), P'an (S. Y.), Regna (P. P.) and coll. — Terramycin, a new antibiotic. *Science*, 1950, **111**, p. 85.

37. Fischer (W.), Kimbel (K. H.), Heinkel (K.). — Untersuchungen über enterale Antibiose bei der Ratte. X. Das Verhalten der Aktivität von Lipase und Diastase des Serums unter oralen Chlor und Oxytetracyclingaben *Z. Ges. Exper. Med.*, 1956, **127**, n° 2, p. 188-202.

38. Fleming (A.). — On the antibacterial action of cultures of Penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenza. *Brit. J. Exp. Path.*, 1929, **10**, p. 226.

39. Follette (J. H.), Shugarman (P. M.), Reynolds (J.), Valentine (W. N.), Lawrence (J. S.). — The effect of chloramphenicol and other antibiotics on leukocyte respiration. *Blood*, 1956, **11**, n° 3, p. 234-242.

40. Frieden (E. H.), Frazier (C. N.). — *Arch. Biochem.*, 1947, **15**, p. 265.

41. Gale (E. F.), Folkes (J. P.). — The assimilation of amino-acids by bacteria. XV. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in staphylococcus aureus. *Biochem. J.*, 1953, **53**, p. 493-498.

42. The assimilation of amino-acids by bacteria. XXI. The effect of nucleic acids on the development of certain

enzymatic activities in disrupted staphylococcal cells *Biochem. J.*, 1955, **59**, 675-684.

43. Gale (E. F.), Paine (T. F.). — The assimilation of amino-acids by bacteria; the action of inhibitors and antibiotics on the accumulation of free glutamic acid and the formation of combined glutamate in staphylococcus aureus. *Biochem. J.*, March 1951, **48**, n° 3, p. 298-301.

44. Gibson (F.), McDougall (B.), Jones (M. J.), Teltscher (H.). — Action de certains antibiotiques sur la synthèse de l'indole par des suspensions d'Eschérichia coli. *J. Gén Microbiol.*, 1956, **15**, n° 3, p. 446-458.

45. Gorini (L.), Torriani (A.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, **2**, p. 226.

46. Gottlieb (D.), Bhattacharyya (P. K.), Anderson (H. A.), Carter (H. E.). — Some properties of an antibiotic obtained from a species of streptomices. *J. Bact.*, 1948, **55**, p. 409.

47. Gros (F.), Beljanski (M.), Macheboeuf (M.). — Mode d'action de la pénicilline sur *Staphylococcus aureus;* inhibition des systèmes enzymatiques extraits de la bactérie *C. R. Acad. Sc.*, 1950, **231**, p. 184.

48. Gros (F.), Macheboeuf (M.). — Comparaison entre les effets biochimiques de la pénicilline et de la thyrothricine sur *Clostridium sporogenes;* effets sur la bactériolyse et la libération autolytique d'ammoniaque. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, p. 360.

49. — *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, p. 398.

50. — Effet de la pénicilline sur le métabolisme glucidique de *Clostridium sporogenes. C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, p. 858.

51. — Métabolisme phospho-glucidique d'un bacille strictement anaérobie, *Clostridium sporogenes. Ann. Inst Pasteur*, 1948, **74**, p. 347-367.

52. — Etudes biochimiques du mode d'action de la pénicilline sur *Clostridium sporogenes*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, p. 368-387.

53. Gros (F.), Macheboeuf (M.), Jeulin (S.). — Mode d'action biochimique de la streptomycine sur le métabolisme de *Clostridium sporogenes*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, p. 242-253.

54. Gros (F.), Rybak (B.), Macheboeuf (M.), Rambeck (U.). — Action de la pénicilline et de la streptomycine sur la dépolymérisation de l'acide ribonucléique par la ribonucléodépolymérase cristallisée. *C. R. Acad. Sc.*, 10 mai 1948, **226**, p. 1550-1552.

55. Hahn (F. E.), Hayes (J. E.), Wisseman (C. L. Jr), Hopps (H. E.), Smadel (J. E.). — Mode of action of chloramphenicol VI. Relation between structure and activity in the chloramphenicol series. *Antibiotics and Chemother.*, 1956, **6**, n° 9, p. 531-543.

56. Hahn (F. E.), Wisseman (C. L. Jr), Hopps (H. E.). — Mode of action of chloramphenicol. II. Inhibition of bacterial D-polypeptide formation by an L-stereo-isomer of chloramphenicol. *J. Bact.*, 1954, **67**, n° 6, p. 674-679.

57. Henry (K. J.), Housewright (R. D.), Berkman (S.). — Effects of streptomycin on metabolism of multiplying bacteria. *J. Bact.*, 1949, **57**, 447.

58. Hines (L. R.). — An appraisal of the effects of long-term chlortetracycline administration. *Antibiotics and Chemother.*, nov. 1956, **6**, n° 11, p. 623-641 (150 réf.).

59. Hopps (H. E.), Wisseman (C. L. Jr), Hahn (F. E.), Smadel (J. E.) Mode of action of chloramphenicol. IV. Failure of selected natural metabolites to reverse antibiotic action. *J. Bact.*, 1956, **72**, n° 4, p. 561-567.

60. Jacobson (K. P.), Cruz (M.). — *Arch. Portug. Sc. Biol.*, 1948, Suppl., **10**, p. 29.

61. Jacobson (K. P.), Deodata de Azevedo (M.). — Mode d'action des antibiotiques sur plusieurs enzymes animaux.

Experimental Medecine and Surgery, 1953, **11**, n° 2, p. 149.

62 Action de plusieurs antibiotiques sur des déhydrases et sur la fumarase bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, p. 1712-1714.

63 Janot (M.-M.), Keufer (J.). — Mecanismes biochimiques de l'activité des antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Tyrothricine). Paris, Masson et Cie, 1953, 74 p., nombreuses références.

64 Keller (H.), Krüpe (W.), Sous (H.), Mückter (H.). — Recherches sur l'abaissement de la toxicité des antibiotiques basiques, des streptomycines. III. Sur le mécanisme de l'intoxication par la streptomycine et les modifications apportées par l'acide pantothénique. *Arzneimittel Forschq*, 1956, **6**, n° 10, p. 585-591.

65 Kimmel (J. R.), Smith (E. L.). — Crystalline Papaïn. *J. Biol Chem.*, 1954, **207**, p. 515-531.

66 King (E. J.), Armstrong (A. R.). — *Journ. Canad. Med. Ass.*, 1934, **31**, 376.

67 Klotz (I. M.), Urguhart (J. M.), Weber (W. W.). — Penicillin-protein complexes. *Arch. Biochem.*, 1950, **26**, p. 420.

68 Korotjaev (A. I.). — Le mécanisme d'action de la chloromycétine (Russe). *Mikrobiologija*, S. S. S. R., 1956, **25**, n° 4, p. 451-457.

69 Kun (E.), Bradin (J. L.), Dechary (J. M.). — Effect of metabolic inhibitors on production of CO_2 and SH_2 by *Entamoeba histolytica*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1952, **80**, n° 4, p. 604-607.

70 Lamanna (A.). — Influenza di antibiotici sul metabolisme dell' arginina negli Stafilococchi. II. Azione di cinque antibiotic sull' attività arginasica degli Stafilococchi *La Sperimentale* (Firenze), 1953, **153**, n° 7-8, p. 197-199.

71. Loomis (W. F.). — Mechanism of action of aureomycin. *Science*, 1950, **111**, p. 474.

72. Macheboeuf (M.). — Etudes biochimiques sur le mode d'action des antibiotiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, p. 161.

73. Martin-Hernandez (D.), La Fuente-Sanchez (G. de), Santos-Ruiz (A.). — Etudes des carboxylases. VIII. Inhibition enzymatique de la carboxylase pyruvique par les antibiotiques dérivés du noyau naphtacénique. *Rev. esp. Fisiol.*, 1956, **12**, n° 2, p. 93-103.

74. — Etudes des carboxylases. IX. Inhibition enzymatique de la carboxylase pyruvique par les antibiotiques du groupe glucidique. *Rev. esp. Fisiol.*, 1956, **12**, n° 2, p. 117-128.

75. — Etudes des carboxylases. XI. Inhibition enzymatique de la carboxylase pyruvique par la pénicilline et les autres antibiotiques non inclus dans le groupe de ceux déjà étudiés. *Rev. esp. Fisiol.*, 1956, **12**, n° 3 p. 225-231.

76. Massart (L.). — *Arch. intern. pharmacodynamie*, 1949, **80**, p. 44.

77. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, p. 223.

78. Massart (L.), Teeters (G.), Lagrain (A.). — *Arch. Intern. Pharm.*, 1948, **76**, p. 72.

79. Massart (L.), Peeters (G.), Vanhoucke (A.). — Acridines and streptomycine. *Experientia*, 1947, **3**, p. 789.

80. Melnykowycz (J.) et Jahansson (K. R.). — Inhibition by antibiotics of the adaptive formation of lysine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Bact. Proc.*, 1956, **43**.

81. Mondolfo (M.), Mondolfo-Hounie (E.). — Sull' antagonismo existente fra l'aureomicina e alcuni fattori metabolici (vitamine del gruppo B, guanina, adenina, ecc.). *Boll. Ist. Sieroter.*, Milan, janv.-févr. 1955, **34**, n° 1-2.

82. Morris (M.), Seastare (C.). — The relationship of M. protein

and resistance to phagocytosis in the β-hemolitic Streptococci. *J. Bact.*, 1955, **69**, p. 195

83. Murray (D. R. P.). — *Biochem. J.*, 1933, **27**, p. 343.

84. Nisman (M. B.), Hirsch (M. L.), Marmur (J.). — Etude de la synthèse des protéines par des fragments cellulaires de *Escherichia coli*. L'incorporation de la valine. *C. R. Acad. Sc.*, 1955, **240**, p. 1939-1941.

85. Oginsky (E. L.), Smith (P. H.), Umbreit (W. W.). — Nature of reaction inhibited by streptomycine. *J. Bact.*, 1949, **58**, p. 747.

86. Olitzki (A. L.). — Atti del Congr. Intern. di Microbiol., Roma, 1953, **4**, p. 186.

87. Hydrogen sulphide production by non-multiplying organism and its inhibition by antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, 1954, **11**, p. 160.

88. Osteux (R.), Laturaze (J.), Burck (Mme J.), Boulanger (P.). — Action de l'auréomycine sur les systèmes enzymatiques bactériens. *J. méd. Bordeaux*, févr. 1953, **130**, p. 393-396.

89. Oxford (A. E.). — *Biochem. J.*, 1942, **36**, p. 638.

90. Pasteur (L.), Joubert (J.-F.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1877, **85**, p. 101.

91. Pasynskii (A.), Kastorskaya (T.). — *Biokhimiya*, 1947, **12**, p. 465.

92. Pelluchon (J.). — La papaïne en application locale dans le traitement des staphylococcies cutanées. Thèse de doctorat en Médecine, Bordeaux, 1949.

93. Piccinelli (O.). — *Farmaco*, Ed. Sc., 1953, **8**, n° 8, p. 480 (118 réf.).

94. Polglase (W. J.). — The effect of dihychostreptomycin on the formation of beta-galactosidase by *Escherichia coli*. *Canadian J. Biochem. Physiol.*, 1956, **34**, n° 3 p. 554-557.

95. Pratt (R.), Dufrénoy (J.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, p. 1671.

96. — Cytochemical mecanism of action of Penicillin; influence of cobalt on optimal bacteriostatic concentration of Penicillin. *J. Bact.*, 1948, **55**, p. 726.

97. Ravina (A.), Wenger (H.). — Le traitement local des ulcères de jambe par l'association de Papaïne et de Pénicilline. *La Presse médicale*, 20 mars 1957, **65**, n° 3, p. 341.

98. Raynaud (M.), Macheboeuf (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, p. 694.

99. Raynaud (M.), Nisman (B.), Cohen (G.-N.). — Réaction de Stickland dans les cultures de *Clostridium sporogenes*, caractéristiques de l'effet inhibiteur de la pénicilline. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, p. 1012.

100. Regna (P. P.). — Relations entre la structure chimique de la Terramycine et son mode d'action. *Transactions of the N. Y. Ac. Sc.*, nov. 1952, **14**, p. 15.

101. Regna (P. P.) and coll. — Chemistry of Terramycin in « Premier Symposium International de Chimie Microbiologique ». O. M. S., Genève 1952.

102. Régnier (S.). — Contribution à l'étude du mode d'action des protéases. Thèse pour le doctorat de l'Université, mention « Pharmacie », Bordeaux, 1950-1951.

103. Rigaud (A.), Brisou (J.), Babix (R.). — Thérapeutiques locales à base de papaïne. *La Presse médicale*, 18 avr. 1956, 64e année, n° 31, p. 722.

104. Roche (J.). — *Exp. Ann. Biochim. Med.*, 1946, p. 93.

105. Rooff (S. M.), Polglase (W. J.). — The assimilation of amino-acids by bacteria. 21. The effect of nucleic acids on the development of certain enzymic activities in disrupted Staphylococcal cells. *Canadian Journ. of Biochem. Physiol.*, sept. 1955, **33**, n° 5, p. 792-796.

106. Rykowski (H.), Perczynski (A.), Baranski (M.). — *Pol. Tyg. lek.*, 1955, **10**, p. 680-684, résumé anglais (7 réf.).

107. Salomon (L.). — Mécanisme de l'action des antibiotiques sur

les bactéries et les ultra-virus. *Rec. Méd. Vétér.* (Alfort), 1953, **129**, n° 5, p. 292-301.

108. Saz (A. K.), Marmur (J.). — The inhibition of organic nitro-reductase by aureomycin in cell free extracts. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, April 1953, **82**, n° 4, p. 783-784.

109. Saz (A. K.), Martinez (L. M.). — Enzymatic basis of resistance to aureomycin. I. Differences between flavoprotein nitro-reductases of sensitive and resistant *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1956, **223**, p. 285-292

110. Saz (A. K.), Slie (R. B.). — The inhibition of organic nitro-reductase by aureomycin in cell free extracts. II Cofactor requirements for the nitro-reductase enzyme complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **51**, n° 1, p. 5-16 (16 réf.).

111. — Reversal of aureomycin inhibition of bacterial cell free nitro-reductase by manganese. *J. Biol. Chem.*, 1954, **210**, n° 1, p. 407-412.

112. Sevag (M. G.), Gots (J. S.), Steets (E.). — *Enzymes*, 1950, **1**, p. 115.

113. Schatz (A.), Bugie (E.), Waksman (S. A.). — Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, **55**, 66.

114. Smith (R. M.), Joslyn (D. A.), Gruhzit (O. M.), McLean (I. W. Jr), Penner (M. A.), Ehrlich (J.). — Chloromycetin Biological studies. *J. Bact.*, 1948, **55**, p. 425.

115. Smith (E. L.), Kimmel (J. R.), Brocon (D. M.). — Crystalline Papaïne. *J. Biol. Chem.*, 1954, **207**, p. 533-549.

Smith (E.L.), Stockell (A.), Kimmel (J. R.). — Crystalline Papaïne. *J. Biol. Chem.*, 1954, **207**, p. 551-561.

116. Strait (L. A.), Dufrénoy (J.), Pratt (R.), Lamb (J.). — *J. Am. Pharm. Ass. Sc.*, Ed. 1948, **37**, p. 133.

117. Swendseid (M. E.), Swanson (A. L.), Bethell (F. H.). — Effect of chloramphenicol administration on Rat-liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, n° 2, p. 811-815.

118. Swendseid (M. E.), Wright (P. D.), Bethell (F. H.). — A growth factor for L. citrovorum synthesized by hemopoïetic tissue reversing aminopterin and chloromycetin inhibition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1952, **80**, p. 689-690.

119. Tayeau (F.), Dulond de Rosnay (C.), Martin-Dupont (M.), Loste (Mme H.). — Complexes protéines sériques-streptomycine. *Journ. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**.

120. Tomizawa (J. I.), Sunakawa (S.). — The effect of chloramphenicol on deoxyribonucleic acid synthesis and the development of resistances to ultraviolet irradiation in *Escherichia coli* infected with bacteriophage T_2. *J. Gen. Physiol.*, 20 mars 1956, **39**, n° 4, p. 553-565 (18 réf.).

121. Truhaut (R.), Lambin (S.), Boyer (M.). — Contribution à l'étude du mécanisme d'action de la chloromycétine vis-à-vis d'*Eberthella typhi*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, p. 387-393.

122. Umbreit (W. W.). — Site of action of Streptomycin. *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, p. 703.

123. — Streptomycin. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1950, **53**, p. 6.

124. — Streptomycin. *Trans. N. Y. Acad. Sc.*, 1952, **15**, n° 1, p. 8-11.

125. Umbreit (W. W.), Oginsky (E. L.). — The mode of action of antibiotics : Penicillin and Streptomycin. *J. Mount Sinaï Hosp.* (New-York), 1952, **19**, n° 1, p. 175-184.

126. Umbreit (W. W.), Smith (P. H.), Oginsky (E. L.). — The action of Streptomycin. V. The formation of citrate. *J. Bact.*, mai 1951, **61**, n° 5, p. 595-604.

127. Umbreit (W. W.), Tonhazy (N. E.). — Action of Streptomycin in tissue homogenates. *J. Bact.*, 1949, **58**, p. 769.

128. Van Meter (J. C.), Olson (J. J.). — Effect of aureomycin on the respiration of normal Rat liver homogenates. *Science*, 9 mars 1951, **113**, n° 2932, p. 273.

129. Van Meter (J. C.), Spector (A.), Obson (J. J.), Williams (J. H.) — *In vitro* action of aureomycin on oxidative phosphorylation in animal tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, oct. 1952, **81**, n° 1, p. 215-217.

130. Various authors. — Symposium of mode of action of antibiotics. *Bact. Rev.*, mars 1953 **17**, p. 17-49.

131. Vendrely (R. et C.). — Données récentes sur les acides nucléiques. *Biologie médicale*, avril-mai 1955, **44**, n° 3, p. 298-346.

132. Waksman (S. A.). — *Antibiobics and Chemother.*, 1951, **1**, n° 1.

133. Wisseman (C. L. Jr), Hahn (F. E.), Hopps (H. E.), Smadel (J. E.). — Chloramphenicol inhibition of protein synthesis. *Federation Proc.*, 1953, **12**, p. 466.

134. Wisseman (C. L. Jr), Smadel (J. E.), Hahn (F. E.), Hopps (H. E.). — Mode of action of chloramphenicol. I. Action of chloramphenicol on assimilation of ammonia and on synthesis of proteins and nucleic acids in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 1954, **67**, n° 6, p. 662-673.

135. Wooley (D. W.). — A study of non-competitive antagonism with chloromycetin and related analogues of phenylalanine. *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, p. 293-305.

136. Yon (J.). — Action de quelques cations dans les réactions de protéolyse. Thèse de doctorat ès Sciences Physiques, Paris, 1955.

137. Zimmerman (H. J.), Humoller (F. L.). — Effect of aureomycin on choline-oxydase and other enzyme systhems of Rat liver. *Am. J. of Physiol.*, déc. 1953, **175**, n° 3, p. 468-472.